

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Stanovení složení mikrobiálních společenstev osidlujících
brambory ve vztahu k jejich živinovému obsahu**

Diplomová práce

Bc. Tereza Suchanová

Výživa a potraviny

doc. RNDr. Markéta Marečková, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Stanovení složení mikrobiálních společenstev osidlujících brambory ve vztahu k jejich živinovému obsahu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2022

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala lidem, bez kterých by tato práce nikdy nemohla vzniknout. Děkuji hlavně své vedoucí práce doc. RNDr. Markétě Marečkové Ph.D. za pomoc, věcné připomínky a bezpočet dobrých rad. Dále děkuji všem členům výzkumného týmu z Výzkumného ústavu rostlinné výroby.

Stanovení složení mikrobiálních společenstev osidlujících brambory ve vztahu k jejich živinovému obsahu

Souhrn

Diplomová práce je zaměřena na složení mikrobiálního společenstva a výskyt aktinobakteriální obecné strupovitosti v souvislosti s obsahem živin v hlízách i listech brambor. Cílem studie založené na nádobovém experimentu bylo zjistit závažnost onemocnění vůči danému onemocnění po přidavcích fosforu, rašeliny a železa do půdy u třech odrůd, které se liší náchylností. Souvislost mezi náchylností odrůd a vlivem živin byla dále hodnocena pomocí složení bakteriálního společenstva osidlujícího brambory.

Složení bakteriálního společenstva bylo stanoveno sekvenováním PCR produktu získaného amplifikací genu pro 16S rRNA z extrahované DNA z bramborového peridermu. Byla použita metoda Illumina Mi-seq. Knihovna vzniklých a upravených sekvencí se sestavila do operačních taxonomických jednotek (OTU) a vytvořily se fylogenetické klastry, které byly řazeny do taxonomických skupin na základně porovnávání s databázovou knihovnou sekvencí. Rozdílnost jednotlivých bakteriálních společenstev byla podpořena statistickou metodou LEfSe.

Nejefektivnější potlačení obecné strupovitosti bylo zaznamenáno u hlíz odrůdy Agria. U této odrůdy byla oproti kontrolní půdě obecná strupovitost signifikantně nižší u půdy ošetřené železem a fosforem. Zároveň byl periderm hlíz této odrůdy bohatý na železo a dusík, ale chudší na fosfor. Odrůda David měla podobné výsledky, ale nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými ošetřeními. U odrůdy Adéla byla prokázána její přirozená rezistence vůči onemocnění. Bylo však dokázáno, že jednotlivá ošetření dokáží snížit závažnost onemocnění na úroveň podobnou supresivní půdě.

Klíčová slova: obecná strupovitost, živinové složení, železo, endofytní společenstvo

Assessment of microbial communities in relationship to nutrient content in potato periderm.

Summary

The diploma thesis is focused on the composition of the microbial community and the severity of potato common scab in connection with the content of nutrients in tubers and leaves of potato plants. The aim of the study, based on a container experiment, was to determine the severity of the disease in three cultivars differing in susceptibility to the disease after the addition of phosphorus, peat and iron to the soil. Relationship between the susceptibility of cultivars and the effect of nutrients was further evaluated using the composition of the bacterial community inhabiting the potato periderm.

The composition of the bacterial community was determined by Illumina Mi-seq sequencing of PCR amplicons of the 16S rRNA genes from the extracted DNA from the potato periderm. The library of cured sequences was compiled into operational taxonomic units (OTU) and phylogenetic trees, which were classified to taxonomic groups on the basis of comparison with the database sequence library. The diversity of individual bacterial communities was supported by the statistical method LEfSe.

The most effective suppression of common scab was recorded in Agria tubers. In this cultivar, the common scab was significantly lower on the periderm from conductive soil treated with iron and phosphorus compared to the control. At the same time, the periderm of tubers of this cultivar was rich in iron and nitrogen, but poor in phosphorus. Cultivar David had similar results, but no statistically significant difference was noted between treatments. Cultivar Adéla has been shown to have natural resistance to the disease. However in general, it was demonstrated that the individual treatments can reduce the severity of the disease to a level similar to suppressive soil.

Keywords: common scab, nutrient composition, iron, endophytic community

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Obecná strupovitost brambor	11
3.1.1 Patogeny podílející se na vzniku strupovitosti	12
3.1.2 Determinanty způsobující strupovitost.....	13
3.1.3 Faktory ovlivňující vznik strupovitosti	15
3.2 Aktinobakterie	16
3.3 Typy půd	17
3.4 Kultivary brambor a jejich rezistence vůči strupovitosti	17
3.5 Živiny ovlivňující vznik strupovitosti	18
3.5.1 Železo	18
3.5.2 Fosfor	19
3.5.3 Dusík.....	19
3.5.4 Vápník	20
3.5.5 Draslík	21
3.5.6 Hořčík.....	21
3.5.7 Síra	22
3.5.8 Rašelina	22
4 Metodika	23
4.1 Materiál	23
4.1.1 Chemikálie	23
4.1.2 Pufry	23
4.1.3 Design experimentu	24
4.2 Metody	25
4.2.1 Extrakce DNA z bramborových slupek.....	25
4.2.2 Polymerázová řetězová reakce	27
4.2.3 Elektroforéza	28
4.2.4 Analýza živin.....	28
4.2.5 Sekvence.....	29
4.2.6 LDA Effect Size (LEfSe)	29
5 Výsledky	31
5.1 Aktinobakteriální obecná strupovitost u vybraných odrůd	31

5.1.1	Strupovitost u odrůdy Agria.....	31
5.1.2	Strupovitost u odrůdy David.....	32
5.1.3	Strupovitost u odrůdy Adéla	33
5.2	Analýza živin v peridermu brambor	34
5.2.1	Obsah železa	34
5.2.2	Obsah dusíku.....	35
5.2.3	Obsah fosforu	36
5.3	Analýza živin – listy	38
5.3.1	Obsah železa	38
5.3.2	Obsah dusíku.....	39
5.3.3	Obsah fosforu	40
5.4	Bakteriální společenstva	42
5.4.1	Bakteriální společenstva u odrůdy David	44
5.4.2	Bakteriální společenstva u odrůdy Agria.....	45
5.4.3	Bakteriální společenstva u odrůdy Adéla	46
5.4.4	Taxonomické složení bakteriálních společenstev	47
6	Diskuse.....	55
7	Závěr	59
8	Literatura.....	60

1 Úvod

Aktinobakteriální strupovitost brambor je onemocnění, se kterým se potýkají pěstitelé brambor po celém světě. V USA ji producenti osiva zařadili mezi pět největších chorob postihující brambory (Dees & Wanner, 2012). Onemocnění nemá za následek snížení výnosnosti brambor, ale má jistý vliv na kvalitu a následnou prodejnost brambor. Kolem místa infekce se na povrchu vytvářejí hnědé léze, které se mohou spojovat a pokrývat velkou část povrchu hlízy (Wanner, 2006).

Za dané onemocnění jsou zodpovědné bakterie z rodu *Streptomyces*, avšak ne všichni zástupci jsou patogenní. Většina těchto zástupců jsou neškodnými půdními saprofyty nebo svou přítomností podporují růst rostliny, či se podílejí na tvorbě antibiotik (Chater, 2016). V dnešní době je popsáno jedenáct patogenních druhů vyskytujících se po celém světě, nejznámějším a nejdéle popsaným druhem je *Streptomyces scabies* (Thaxter 1981) (Loria et al., 2006). Jejich patogenita je zapříčiněna produkcí fyto toxických metabolitů thaxtominů, které byly poprvé popsány již v roce 1989 (King et al., 1989).

Jedním z faktorů podílejících se na kontrole onemocnění obecnou strupovitostí je úprava pH půdy. Již dříve bylo popsáno, že závažnost onemocnění byla nižší v půdách s pH <5,2 (Hornby, 1998). Avšak o několik let později se prokázalo, že existují i jiné patogenní druhy, které jsou schopny způsobovat onemocnění i v kyselějších půdách (Lambert et al., 2005). Jedním z problémů při kontrole onemocnění pomocí pH by mohly být vysoce pufované půdy (Lazarovits et al., 2007).

Dalším aspektem ke snížení závažnosti onemocnění je zvolení vhodné odrůdy. Vzhledem k tomu, že nebyl zcela objasněn princip rezistence, doposud nebyla vyšlechtěna odrůda, která by byla zcela rezistentní vůči onemocnění (Clarke et al., 2019). Byly však vyšlechtěny odrůdy, které jsou méně náchylné, a díky nim zůstává závažnost onemocnění nižší i v půdách příznivých pro patogeny. Je i prokázáno, že jednotlivé odrůdy se liší ve svých požadavcích na jednotlivé živiny. A jejich dodávání do půdy může vést k prevenci onemocnění (Nahar et al., 2018).

Zemědělské půdy jsou často chudé na jednu nebo i více živin. Nedostatek živin vede k neoptimálnímu růstu rostlin, ale také ke snížení rostlinné imunity. Jedním z mechanismů ochrany rostlin je poskytování dostatečného množství živin a dodávání do půdy zejména fosforu, dusíku či stopových prvků (Dordas, 2008). Onemocnění obecnou strupovitostí je potencionálně ovlivněno rostlinnými minerálními živinami. Již dříve bylo uvedeno, že se závažností onemocnění souvisí obsah dusíku, fosforu, draslíku, vápníku, hořčíku, železa, zinku, manganu, mědi a hliníku v půdě nebo

v rostlinné tkáni (Lambert et al., 2005). Použití živin pro kontrolu onemocnění bylo zkoumáno, ale účinky se lišily podle odrůdy, umístění i podle roku (Lazarovits, 2010).

2 Cíle práce

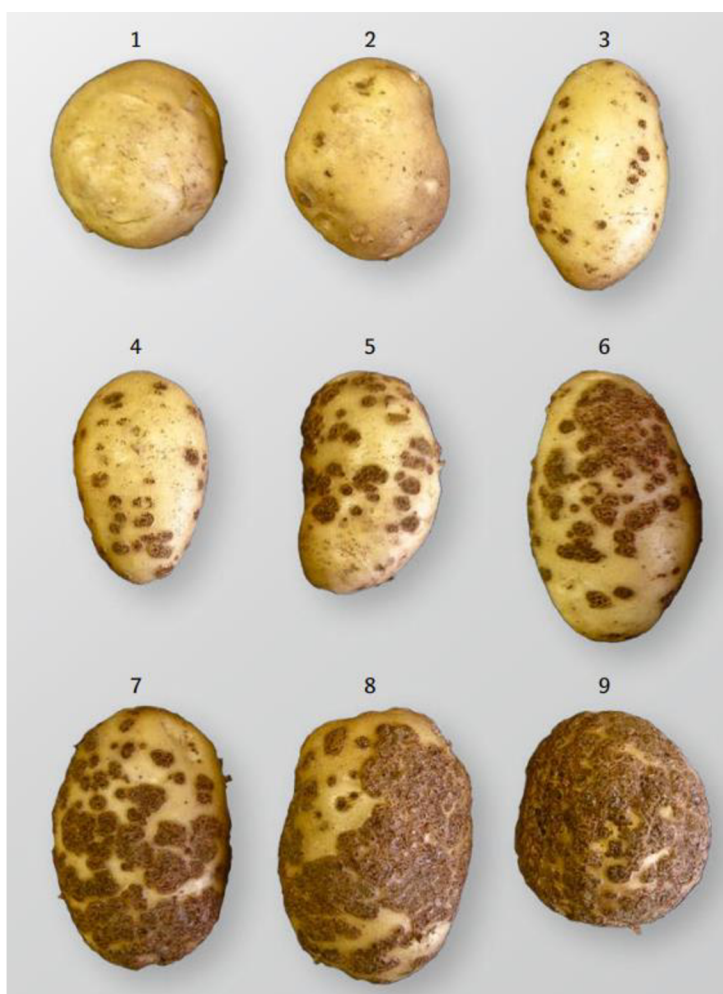
Dílními cíli diplomové práce byly:

- zjistit závažnost obecné strupovitosti u odrůd Agria, David a Adéla v závislosti na různých půdních podmínkách;
- prokázat vztah mezi živinovým složením hlíz brambor a mikrobiálním společenstvem osidlující periderm;
- určit, zda přídavek některých živin omezí rozvoj obecné strupovitosti brambor.

3 Literární rešerše

3.1 Obecná strupovitost brambor

Strupovitost brambor je celosvětovým problémem, jenž nemá za následek snížení výnosnosti brambor, ale ovlivňuje kvalitu a prodejnost postižené plodiny. Vzhledem k tomu, že jsou brambory ekonomicky důležitou plodinou v mnoha regionech, je strupovitost závažnou chorobou v zemědělském průmyslu, způsobující celosvětové ztráty na výnosu (Loria et al., 2006). Ztráta výnosnosti brambor je také způsobená zasycháním mladých hlíz brambor, které byly masivně napadeny patogenem (LERAT et al., 2009). Dle vyhlášky č. 291/2010 Sb. je v České republice přípustný výskyt obecné strupovitosti na povrchu raných i pozdních konzumních brambor uváděn jako $\frac{1}{4}$ povrchu ("Sbírka zákonů Česká republika", 2010). To odpovídá stupni 4 na stupnici napadení hlíz (Obr. 1) (Hausvater et al., 2020).



Obr. 1 Stupnice napadení hlíz obecnou strupovitostí (Hausvater et al., 2020)

V jedné studii, která byla zaměřena na ekonomický výnos z prodeje brambor v Kanadě, uvedlo 82 % kanadských farmářů ztráty způsobené strupovitostí. Celkové ztráty v roce 2002 činily okolo 17 miliónů dolarů, což průměrně na jednoho farmáře připadlo okolo 8 tisíc dolarů (Hill & Lazarovits, 2005).

Obecná strupovitost se dělí do tří skupin. Dříve byla strupovitost popisována jako jediná choroba, způsobená patogenní bakterií *Streptomyces scabiei* (LAMBERT & LORIA, 1989a). Tento patogen se vyskytuje přednostně v půdách s nízkým obsahem vlhkosti a s pH v rozmezí od 5,5 do 7,5 (Hudec et al., 2021). Za nedlouho se však objevila strupovitost i na polích s nízkými hodnotami pH. Patogen způsobující tzv. kyselou strupovitost je *Streptomyces acidiscabiei* (Lambert and Loria 1989) (LAMBERT & LORIA, 1989b). Posledním typem je síťovitá forma strupovitosti. Tento typ způsobuje patogenní agens *Streptomyces reticuliscabiei* (Bouchek-Mechiche et al. 2000) (Bouchek-Mechiche et al., 2006). Avšak jednotlivé formy lze od sebe odlišit velice obtížně, jelikož většina druhů způsobuje za různých podmínek rozdílné příznaky (Dees & Wanner, 2012).

Příznaky strupovitosti se liší od povrchových po hluboké léze nebo se mohou vytvářet i vyvýšené léze. Léze bývají malé, ale také se slučují a pokrývají velké plochy povrchu hlízy. Léze jsou korkovité a mají hnědé zbarvení (Wanner, 2006). Přestože patogenní bakterie mají široké hostitelské rozmezí, nedochází k projevu příznaků strupovitosti na všech tkáních a vývojových stádiích rostliny. Nadzemní části rostliny napadené patogenem zůstávají zdravé. Příznaky jsou znatelné na podzemních částech s výjimkou kořenů. Postiženy jsou nejvíce stonky pod povrchem a hlízy brambor. Anatomické a fyziologické změny se vyskytují během vývoje hlíz (Dees & Wanner, 2012). Ve vývoji příznaků hrají roli různé faktory: výběr kultivaru brambor, podmínky prostředí, virulence patogenů a hustota inokula patogenů (Lazarovits et al., 2007). Avšak příznaky nejsou druhově specifické a nelze je použít k identifikaci patogenu (LAMBERT & LORIA, 1989a). Dle studie z roku 2004 se na jednom poli, rostlině či v jedné lézi může vyskytovat více patogenních i nepatogenních bakterií společně (Lehtonen et al., 2004). Příkladem je tomu Norsko, kdy na stejném poli a i ve stejné lézi byli izolováni dva zástupci z rodu *Streptomyces* – *Streptomyces europaeiscabiei* (Bouchek-Mechiche et al. 2000) a *Streptomyces turgidiscabies* (Miyajima et al. 1998) (Dees et al., 2013).

3.1.1 Patogeny podílející se na vzniku strupovitosti

Strupovitost brambor způsobují patogenní bakterie z rodu *Streptomyces* spp., tyto bakterie se vyskytují na celém světě a dokážou se přizpůsobit různým půdním podmínkám. Většina druhů z tohoto rodu je neškodnými půdními saprofyty. Někteří

zástupci rodu *Streptomyces* podporují růst rostlin nebo jsou hojně studovány jako organismy produkující antibiotika (Chater, 2016). Bakterie rodu *Streptomyces* jsou zdrojem řady dalších protizánětlivých, imunitně potlačujících a antimikrobiálních látek (Hopwood, 2006). V současné době existuje přibližně jedenáct popsaných druhů *Streptomyces* způsobujících strupovitost brambor (Loria et al., 2006). Všechny patogenní bakterie mohou způsobit toto onemocnění i na další kořenové zelenině, jako je mrkev, tuřín či ředkvičky (Loria et al., 1997a). Patogenní bakterie se vyskytují po celém světě a působí škody ve všech státech, kde jsou pěstovány brambory.

Prvním popsaným druhem patogenu způsobujícího strupovitost brambor byl *Streptomyces scabies* (LAMBERT & LORIA, 1989a). Tento nejznámější zástupce se považuje za kosmopolitní druh v distribuci. Dle několika studií se však ukázalo, že v Evropě je jeho výskyt zaznamenán jen zřídka (Bouček-Mechiche et al., 2000b; Flores-González et al., 2007). *Streptomyces scabies* je bakterie, která je díky své vláknité morfologii podobná houbě. Mycelium se skládá z tenkých rozvětvených hyf. Válcovité výtrusy se produkují ve zralých válcovitých řetězcích obsahujících nejméně 20 výtrusů (LAMBERT & LORIA, 1989a). Jejich spóry se uvolňují z hyf a prostřednictvím těchto sporů je bakterie rozptýlena a přežívá na semenech, v půdě či půdní vodě (Loria et al., 2006). Spóry klíčí a vstupují do rostlinných tkání skrze poškozená místa např. larvami. Mladé hlízy jsou nejnáchylnější k napadení až 4 týdny od iniciace hlíz (Braun et al., 2017). Odumírající rostlinné buňky poskytují patogenu živiny. Následné dělení hostitelských buněk v okolí infekce způsobuje tvoření vrstvy korkových buněk, které se vytlačí ven a způsobují léze na hlízách brambor (Bouček-Mechiche et al., 2000a). V minulosti byl pouze tento zástupce považován za patogenní. Avšak s vývojem molekulární analýzy se ukázalo, že existují i další druhy bakterií způsobující běžnou strupovitost (Goyer et al., 1996).

Jedním z těchto patogenních agens je *Streptomyces europaeiscabiei*, který byl poprvé popsán ve Francii (Bouček-Mechiche et al., 2000a). V nedávné době byl *Streptomyces europaeiscabiei* izolován na poli ve Španělsku (Sarwar et al., 2019). Ač se tento druh zdál být zcela typickým pouze pro Evropu, byl jeho výskyt hojně zaznamenán i v Severní Americe (Wanner, 2009). Dalším popsaným patogenem je *Streptomyces acidiscabies*, jehož výskyt je popsán zejména v Koreji či Japonsku (Song et al., 2004).

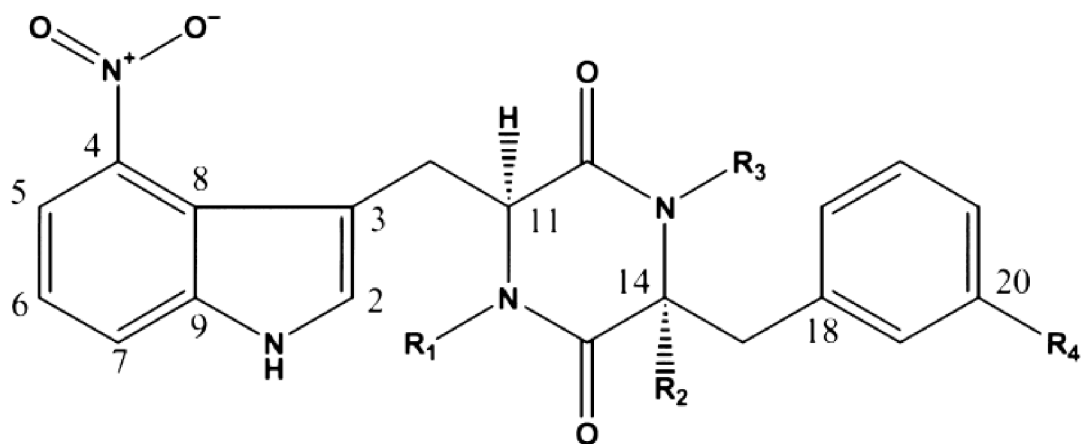
3.1.2 Determinanty způsobující strupovitost

Patogenní streptomycety jsou schopny produkovat fytotoxické metabolity označované jako thaxtominy. Thaxtomin byl poprvé popsán a izolován Kingem a Lawrencem v roce 1989. Převládajícím fytotoxinem produkovaným *S. scabies*

je thaxtomin A (King et al., 1992). V roce 2000 bylo prokázáno, že thaxtomin A je zodpovědný za patogenitu streptomycet (Healy et al., 2000). Mimo tento patogenní determinant je popsáno dalších 11 druhů thaxtominu, lišících se od sebe acylovými skupinami (Bignell et al., 2010).

Thaxtomin A způsobuje snížení krystalické celulózy v buněčné stěně, ovlivňuje expresi genů podílejících se na primární a sekundární syntéze buněčné stěny. Dopad na syntézu celulózy je primárním způsobem působení tohoto fytotoxinu (Bischoff et al., 2009). Dále má za následek zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů. Tato reakce vede k okyselení a následnému narušení buněčné stěny a přispívá ke spuštění programované buněčné smrti indukované thaxtominem (Bignell et al., 2014).

Thaxtominy jsou cyklické dipeptidy složené z jedné molekuly tryptofanu a jedné molekuly fenylalaninu. Aminokyseliny jsou spojeny bimodulární peptidovou syntézou, která se označuje jak txtA a txtB. Na organickou kostru se připojují methylové skupiny pomocí txtA a txtB (Healy et al., 2000). Díky monooxygenáze P450 se ke kostře připojují hydroxylové skupiny. Pomocí syntázy oxidu dusnatého (NOS) se k indolovému kruhu na tryptofan do polohy 4 připojuje nitroskupina, jež je zodpovědná za fytotoxicitu thaxtominů (Healy et al., 2002).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Thaxtomin A	CH ₃	OH	CH ₃	OH
Thaxtomin B	CH ₃	OH	CH ₃	H
Thaxtomin C	CH ₃	H	H	H

Obr. 2 Struktura thaxtominů produkovaných patogenními streptomycetami (Healy et al., 2002)

Produkce thaxtominu je indukována sloučeninami pocházejícími z rostlin včetně celobiózy, která je tvořena částečnou hydrolýzou celulózy a suberinu přítomného na povrchu hlíz brambor (LERAT et al., 2009). Geny syntetizující thaxtomin se nacházejí na ostrově patogenity (PAI), jenž je mobilní a konzervovaný (Loria et al., 2006). U *Streptomyces scabies* je ostrov patogenity rozdělen na 2 odlišné oblasti. První tato oblast obsahuje geny pro syntézu thaxtominu a nazývá se toxikogenní oblast. Druhou oblastí je kolonizační oblast, která obsahuje geny přispívající k virulenci, jedná se o geny *nec1* a *tomA* (LERAT et al., 2009). Gen *nec1* kóduje protein, který indukuje nekrózu v rostlinné tkáni. Přispívá tak k virulenci, ale není nezbytný pro patogen (Wanner, 2009). Vzhledem k tomu, že tento protein je produkován před syntézou thaxtominu, tak se předpokládá, že *nec1* potlačuje obranyschopnost rostlin (Joshi et al., 2007). Enzym tomatináza se řadí do rodiny saponináz a vyskytuje se ve fytopatogenních houbách. Za produkci tohoto enzymu je zodpovědný gen *tomA*, který je možným stimulantem potlačení reakce hostitele na infekci (Seipke & Loria, 2008).

3.1.3 Faktory ovlivňující vznik strupovitosti

Populace patogenu se vyvíjí zejména při vyšších teplotách a snižování vlhkosti půdy. Patogenní kmeny jsou potlačovány antagonistickými bakteriemi, které jsou méně náročné na půdní kyslík a vyskytují se ve vlhčí půdě. Dle Waterera (2002) lze včasnou výsadbou potlačit patogen a snížit výskyt strupovitosti vlivem nižší teploty. Nicméně toto opatření vedlo k celkově nižší výnosnosti (Waterer, 2002). *Streptomyces scabies* způsobuje onemocnění v půdách s celkovou půdní vlhkostí pod 70 %. Ke snížení výskytu onemocnění mohou pěstitelé přispět udržováním půdní vlhkosti v rozmezí 80–85 %, dokud nemají hlízy v průměru přibližně 30 mm (Braun et al., 2017). Výskyt choroby je podmíněn hodnotou pH, kdy při vyšší hodnotě nad 5,5 dochází k vyšší strupovitosti. Bylo prokázáno, že snižování pH na hodnotu <5,2 dokázalo snížit výskyt onemocnění na mnoha místech (Hornby, 1998). Avšak Lambert (2005) poukazuje na fakt, že *Streptomyces acidiscabies* může způsobovat onemocnění v půdách s hodnotou pH od 3,8 (Lambert et al., 2005). *S. turgidiscabies* je dalším patogenním druhem, jenž je schopen růst při nižších hodnotách pH, hraniční hodnota je 4,2 (Lindholm et al., 1997). Snižováním pH lze eliminovat rozvoj strupovitosti, ale nižší hodnoty mohou mít vliv na rozvoj houbových patogenů a ovlivnit tak složení bakteriálního společenstva (Rousk et al., 2010). Waterer (2002) ve své studii zkoumal vliv vyššího pH v rozmezí 7–9 na strupovitost a popisuje, že tyto hodnoty mají za následek snížení výskytu strupovitosti bez značného poklesu výtěžnosti brambor (Waterer, 2002).

Chorobě také napomáhají písčité lehké půdy s vyšším obsahem kamene (Hausvater et al., 2016).

3.2 Aktinobakterie

Mezi aktinobakterie patří grampozitivní bakterie s vysokým obsahem C+G párů. Tvoří jeden z největších bakteriálních kmenů a vyskytují se ve vodním i půdním ekosystému. Během svého života procházejí složitou morfoloogickou diferenciací. Mají rozsáhlý sekundární metabolismus a produkují většinu přirozených antibiotik, která slouží pro klinické použití. Dále produkují sloučeniny, které mají protirakovinné a antifungální účinky. Vzhledem k širokému spektru využití mají velký význam v zemědělství, biotechnologii a medicíně. Aktinobakterie jsou důležité jako patogeny či symbionty v bakteriálních společenstvech vyskytujících se v rostlinách (Barka et al., 2015).

Aktinobakterie se vyskytují zejména v půdě, ale i ve sladké a slané vodě či ve vzduchu. Nacházejí se nejen na povrchu půdy, ale i v hloubce více než dva metry pod zemí. Součástí mikrobiální populace jsou v půdách bohatých na organické látky a alkalických půdách (Goodfellow & Williams, 1983). V půdě převládá populace rodu *Streptomyces*, který představuje více než 95 % kmenů izolovaných z půdy. Hustota populace závisí na převládajících klimatických podmínkách a na stanovišti aktinobakterií (Goodfellow & Williams, 1983). Důležitou roli v růstu populace hrají další faktory, jako je pH a vlhkost půdy. Ideální hodnota pH se pohybuje mezi 6–9, maximální růst je okolo neutrální hodnoty. Avšak bylo izolováno několik kmenů *Streptomyces* z kyselé půdy, kdy pH mělo hodnotu 3,5. Většina aktinobakterií je stejně jako ostatní půdní mikroorganismy mezofilní a optimální teplota pro jejich růst je 25–30 °C. Existují však i termofilní kmeny, které vyžadují pro růst teplotu mezi 50 a 60 °C (Kim, 2003).

Ve většině ekosystémů aktinobakterie slouží k rozkladu organické hmoty, biologickému zvětrávání a ke zlepšení růstu rostlin. Aktinobakterie jsou významnými producenty hydrolytických exoenzymů. Díky těmto exoenzymům jsou schopny rozložit těžko rozložitelné sloučeniny (Ventura et al., 2007). Organická hmota je složena z jednoduchých nebo složitých sacharidů, které jsou v půdě přítomny jako stavební materiál prokaryotických a eukaryotických organismů. Mezi sloučeniny, které jsou snadno přístupné pro aktinobakterie řadíme celulózu, hemicelulózu, chitin a lignin (Anderson et al., 2012).

3.3 Typy půd

Existují dva typy půdy, které svým složením mohou ovlivňovat vznik strupovitosti brambor. Dělí se na superesivní a konduktivní půdu.

Supresivita je definována jako přirozená schopnost půdy potlačit nebo snížit aktivitu rostlinných patogenů (Durán et al., 2018). Přítomnost mikroorganismů zvyšuje odolnost ekosystému, díky čemuž je půda méně zranitelná vůči krátkodobým změnám v životním prostředí. V supresivních půdách je vývoj onemocnění minimální i přes přítomnost patogenu, vnímavého hostitele rostlin a klimatické podmínky příznivé pro rozvoj onemocnění (Mazzola, 2002). Na mnoha místech již byla definována pole se supresivním charakterem. Na všech těchto místech byla přirozená schopnost potlačovat strupovitost přičítána interakcím mezi antagonistickou mikroflórou a patogeny zprostředkovanými produkcí antibiotik nebo enzymatickou aktivitou. Supresivita se může vytvořit na poli po několika letech, kdy zde byly pěstovány monokultury plodin (Sagova-Mareckova et al., 2015).

Konduktivní typ půdy je charakterizovaný vysokým obsahem dusíku, uhlíku a nízkým obsahem železa. Hodnota pH je také vyšší než v půdě potlačující onemocnění (Sarikhani et al., 2016).

3.4 Kultivary brambor a jejich rezistence vůči strupovitosti

Vzhledem k tomu, že doposud nebyl objasněn princip rezistence, nebyla vyšlechtěna odrůda, která by byla zcela rezistentní vůči vzniku onemocnění (Wilson et al., 2009). Byly však objeveny odrůdy, které jsou tolerantnější a díky nim zůstává závažnost onemocnění nižší i za příznivých podmínek a vysoké prevalence onemocnění (Nahar et al., 2018).

Většina komerčně významných odrůd brambor nemá vysokou úroveň odolnosti proti strupovitosti. Kultivary mají rozdílné požadavky na obsah živin a jejich dodáváním v dostatečném množství do půdy může vést k prevenci onemocnění (Nahar et al., 2018). Například kultivar Agria má vyšší požadavky na železo. Nedostatek železa v tomto případě by mohl vést k vyšší náchylnosti k chorobám (Kopecky et al., 2019). Ve studii z roku 2016 byly porovnávány tři kultivary brambor. Bylo dokázáno, že kultivar Agria oproti dalším kultivarům měla vyšší obsah P, Ca, Mg a Fe v peridermu. V peridermu tohoto kultivaru byl také zvýšený podíl aktinobakterií a počet kopií genu txtB (Sagova-Mareckova et al., 2016a).

Výzkumný ústav bramborářský v Havlíčkově Brodě udává průměrné procentuální napadení aktinobakteriální obecnou strupovitostí u různých kultivarů

brambor pěstovaných v České republice. Hodnoty pro kultivary použité v praktické části jsou uvedeny v tabulce 1 (Hausvater et al., 2016).

Tabulka 1. Procentuální napadení kultivarů brambor (Hausvater et al., 2016)

Kultivar	Průměrné napadení [%]	Počet let hodnocení
Agria	28	8
Adéla	81	5
David	57	10

3.5 Živiny ovlivňující vznik strupovitosti

Jedním možným způsobem ochrany rostlin je dodání dostatečného množství živin do půdy. Mezi dodávané živiny patří zejména dusík, fosfor, draslík, ale i stopové prvky (Dordas, 2008). Zemědělské půdy jsou chudé na živiny, jelikož produkce plodin vyčerpává zejména mikroživiny, zatímco makroživiny jsou hojně do půdy dodávány (Kopecky et al., 2021). Nedostatečná zásoba živin vede k neoptimálnímu růstu rostlin a ke snížení jejich imunitního stavu (Aznar et al., 2015).

V době vegetačního růstu vyžadují brambory optimální hladinu základních živin. Zejména v období rychlého růstu může být závažnost onemocnění ovlivněna nedostatečným příjmem živin (Hopkins et al., 2014). Rostliny brambor reagují na přítomnost patogenu způsobujícího strupovitost hromaděním mikro a makroelementů. Byla prokázána významná interakce mezi stupněm napadení a obsahem Fe, P, Ca, K a dalších prvků v bramborovém peridermu nebo jiných částech rostliny (Sagova-Mareckova et al., 2016a). Akumulace různých živin v bramborovém peridermu je výsledkem různých procesů. Z tohoto důvodu lze jen některé použít k potlačení strupovitosti (Kopecky et al., 2021).

3.5.1 Železo

Železo je čtvrtým nejrozšířenějším prvkem na Zemi, a přesto je jeho obsah v půdě nedostatečný. Vyskytuje se zejména jako železitý iont, který je téměř nerozpustný. Nedostatek železa je ve všech alkalických půdách, ale i v půdách s nízkou mikrobiální aktivitou (Aznar et al., 2015). Množství železa pro asimilaci živými organismy je velmi nízké. Rostliny i mikroorganismy vyžadují vysoký příjem železa, nedostatek ho je zejména v rizosféře, kde mají velké nároky na železo rostliny, bakterie i houby (Colombo et al., 2014). Bakterie jsou schopny produkovat organické kyseliny a syntetizovat siderofory s nízkou molekulovou hmotností. Siderofory jsou molekuly s vysokou afinitou k železitým iontům. Bakterie jsou schopny tvořit membránové

receptory, vázající komplexy Fe-siderofory. Železo dodané rostlinnými půdními bakteriemi je důležité, pokud jsou rostliny vystaveny environmentálnímu stresu. Siderofory jsou schopny zmírňovat napětí, kterým na rostliny působí těžké kovy (Glick, 2012).

Dostupnost železa lze zlepšit přidavkem organických látek, které zvyšují mikrobiální aktivitu, ale také hnojením organickými látkami s vázaným železem. Po obohacení půdy železem je pozorováno potlačení strupovitosti brambor, i když množství kopií genů thaxtominu zůstává stejné. Je tedy zřejmé, že železo podporuje zvýšení imunity rostlin a snižuje virulenci patogenů (Sarikhani et al., 2016).

3.5.2 Fosfor

Fosfor je nezbytný pro růst rostlin a jako jeden z mála makroelementů je zapojen do všech procesů v rostlině (Hopkins et al., 2014). Nachází se v půdě v poměrně vysokém množství, ale není dostatečný pro podporu růstu rostlin. Většina tohoto fosforu je v nerozpustné formě. Anorganická nerozpustná forma fosforu je apatit a jeho organické formy jsou fosfomonoestery či fosfotriestery (Glick, 2012).

Omezený obsah fosforu je ve starých půdách. V půdě dochází k mnoha fyzikálně-chemickým a biologickým reakcím, při kterých se spotřebovává fosfor, ač je pouze malá část fosforu v biologicky dostupné formě (Richardson & Simpson, 2011). Do půdy se dodává v organické podobě za předpokladu, že je půda mírně kyselá. Nedostatek fosforu má v rostlině za následek spoustu stresových a adaptačních změn (HAMMOND, 2004). Změny mohou vést k vylučování organických kyselin kořenem, což způsobí změnu rovnováhy fosforu v rizosféře. Toto může ovlivnit vývoj specifických mikrobiálních skupin včetně patogenů (Kopecky et al., 2021).

Vysoký obsah fosforu byl pozorován na polích potlačující strupovitost (Sagova-Mareckova et al., 2015). Závažnost onemocnění měla nepříznivý vztah k celkovému obsahu fosforu v peridermu i v půdě (Krišťufek et al., 2015). Brambory mají relativně velké nároky na fosfor, ale nedokážou ho účinně absorbovat z půdy (Hopkins et al., 2014). Vhodné je vybírat kultivary brambor se schopností absorbovat fosfor, jelikož se jednotlivé kultivary liší v účinnosti využití fosforu (Krišťufek et al., 2015).

3.5.3 Dusík

Dusík je jednou z nejdůležitějších makroživin pro růst a vývoj biomasy. Rostliny mohou dusík využívat v různých formách, nejčastěji jako amonium nebo dusičnan (Silva et al., 2013). Je součástí mnoha sloučenin jako je chlorofyl, aminokyseliny, proteiny, nukleové kyseliny a koenzymy, tím je nezbytný k růstu rostlin (Andrews et al., 2013).

Dusík je v půdách přirozeně v malém množství, proto musí být do půd přidáván. Jeho zásoba je doplňována amoniakem uvolňovaným z mrtvé biomasy mikrobiálními rozkladači a z atmosféry fixací symbiotickými bakteriemi (Kopecky et al., 2021). Zvýšená dodávka dusíku do půdy může zvýšit podíl velkých hlíz (Zebarth & Rosen, 2007). V některých půdách jsou přítomny horniny, mající velký podíl dusíku a není pak nutné dodávat dusík do půdy hnojením (Kopecky et al., 2021).

Nízký obsah dusíku v půdě omezuje patogeny a bylo tedy prokázáno, že nízký obsah dusíku a uhlíku v půdě souvisí s kontrolou strupovitosti brambor (Sagova-Mareckova et al., 2015). Vysoký podíl dusíku v půdě má za následek zvýšení náchylnosti rostlin k chorobám. Nepříznivý účinek lze regulovat vyváženým poměrem N:K hnojiv. Obsah dusíku by měl být kontrolován z hlediska rovnováhy s jinými živinami a jeho hnojení by mělo být vyhodnoceno pro kontrolu strupovitosti (Kopecky et al., 2021).

3.5.4 Vápník

Celkový obsah vápníku v půdě se pohybuje kolem 0,15 %–6 %. Nejméně vápníku se nachází v písčítých půdách. Naopak nejvíce vápníku je obsaženo v půdách karbonátových.

Vápník je nezbytným mikronutrientem pro pěstování brambor. Ovlivňuje stabilitu a funkci membrán a má vliv na strukturu buněčné stěny. Vápník reguluje signalizaci rostlinných buněk, dělení buněk a metabolismus sacharidů (Koch et al., 2020). Umožňuje rostlině komunikovat s vnějším prostředím na úrovni rostlinné buňky. Komunikace je zapříčiněna různými podněty jako je sucho, oxidační stres či působení patogenů (Whalley & Knight, 2013).

Příjem vápníku z půdy je dostatečný a nemá vliv na omezení růstu rostlin, jelikož je složkou primárních i sekundárních minerálů a je běžně přítomen v iontové formě Ca^{2+} , která je biologicky dostupná. Avšak může být adsorbován na půdní koloidní komplexy nebo v důsledku okyselování půd způsobené člověkem (Koch et al., 2020).

Hladina vápníku v lézích postižených brambor je zvýšena a je ještě vyšší v suchých půdách. Vyšší množství vápníku je také nacházeno u náchylných kultivarů (Křišťůfek et al., 2015). Obsah vápníku interaguje s mnoha dalšími půdními živinami, pH, vlhkostí půdy a s genetikou rostlin. Na základě těchto zjištění se celkový obsah vápníku v půdě nejeví jako dobrý ukazatel strupovitosti na bramborách (Lambert et al., 2005). Ovšem s ovlivňováním vápníku v půdě se může přispět k prevenci onemocnění, jelikož různé druhy patogenních streptomycet rostou při různých hodnotách pH (Loria et al., 1997b).

3.5.5 Draslík

Draslík se ze všech makronutrientů v hlízách brambor vyskytuje v nejvyšší koncentraci. Celkem je to přibližně 400 mg na 100 g čerstvé brambory (White & Broadley, 2009). Hlavní funkcí draslíku v rostlinách je kontrola aktivity enzymů, kationto-aniontová homeostáza a membránová polarizace. Je nezbytný pro regulaci turgoru či buněčnou extenzi (Adams & Shin, 2014). Důležitou rolí v enzymové aktivitě je stimulace syntázy škrobu pro jeho syntézu. Nedostatek draslíku by mohl mít za následek snížení počtu listů a jejich nedostatečný růst (Jáklí et al., 2016). Zdrojem draslíku jsou slídy a živce, jež ho uvolňují do půdy v průběhu zvětrávání. Před jeho suplementací do půdy je tedy nutné brát v úvahu přítomnost těchto minerálů a obsah jílové půdy (Xiao et al., 2017).

Ač je draslík nejvíce zastoupenou živinou, jeho dopad na dané onemocnění je různý. Koncentrace draslíku měřená v peridermu hlíz nesoúvisela s výskytem nebo závažností onemocnění u různých kultivarů brambor (Krišťufek et al., 2000). Další studie udává, že draslík obsažený v půdě souvisel se závažností obecné strupovitosti (Lazarovits et al., 2007). Pro prevenci onemocnění je důležité udržovat draslík v rovnováze s dalšími živinami. Je také možné vybírat kultivary brambor, které jsou schopny absorbovat větší množství draslíku (Krišťufek et al., 2015).

3.5.6 Hořčík

Nedostatek hořčíku může vést ke zhoršení růstu rostlin a celkové výnosnosti. Má totiž mnoho klíčových rolí, jako je syntéza proteinů a regulace enzymů (Senbayram et al., 2015). Společně s draslíkem se účastní stejných fyziologických pochodů. Mezi ně patří regulace kation-anionové rovnováhy a regulace turgoru v buňkách (Koch et al., 2020).

Půdu chudou na hořčík lze v případě potřeby obohatit dolomitem, což je v případě hořčíku nejpoužívanější hnojivo (Kopecky et al., 2021). Suplementace hořčíkem závisí na celkovém poměru společně s draslíkem. Doporučený poměr je 3:1 ve prospěch draslíku (Koch et al., 2019).

Závažnost onemocnění klesá v půdách bohatých na vyměnitelné ionty včetně hořčíku. V těchto půdách nebyla na bramborových hlízách přítomna patogenní bakterie *Streptomyces scabies*. Supresivní půdy jsou v porovnání s půdami konduktivními bohaté na hořčík (Sagova-Mareckova et al., 2015). Vyšší obsah hořčíku se také vyskytuje v rezistentních bramborách oproti náchylnějším kultivarům (Kopecky et al., 2019).

3.5.7 Síra

Nedostatek síry v půdním prostředí může mít za následek negativní prospívání rostlin a může snížit celkový výtěžek, jelikož je nezbytná pro mnoho metabolitů (Koprivova & Kopriva, 2016). Již v roce 1994 bylo zjištěno, že rostliny s nižším obsahem síry byly chudé na aminokyseliny obsahující síru (Eppendorfer & Eggum, 1994).

Přítomnost síry v půdě nemá žádnou souvislost se strupovitostí brambor (Sagova-Mareckova et al., 2016a).

3.5.8 Rašelina

Rašelina je přírodní produkt získaný postupnou akumulací rostlinných a mechových zbytků, které se rozkládají v podmáčeném prostředí. Během tohoto rozkladu ztrácí rašelina schopnost potlačovat onemocnění, což je důsledkem postupné redukce celulózy, sacharidů a snadno rozložitelných organických zbytků (Sarikhani et al., 2016).

V nedávné studii byla rašelina přidávána do půdy společně se železem (Sarikhani et al., 2016). Samotné železo nebylo schopné snižovat závažnost onemocnění tak účinně jako přídavek rašeliny či kombinace rašeliny a železa. Přídavek rašeliny do konduktivní půdy způsobil snížení patogenních bakterií a aktinobakterií. Je tedy zřejmé, že rašelina má přímý účinek na producenty thaxtominu. V této studii byla půda pufrována, tak nedošlo po přidavku rašeliny ke snížení pH. Snížení závažnosti onemocnění bylo tedy přisuzováno změně kvality organické hmoty, která podporovala antagonistické mikroorganismy. Patogenní *Streptomyces* má v půdě saprofytickou povahu. Přídavek rašeliny s kombinací železa může udržet patogen v této saprofytické povaze, aniž by došlo k virulenci (Sarikhani et al., 2016). Vlivem rašeliny na snížení pH se zabývala již dřívější studie (Carlgren & Mattsson, 2001). Snížením pH se docílí zamezení výskytu některých patogenních druhů *Streptomyces*, o čemž již bylo pojednááno v podkapitole 3.1.3.

4 Metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Tabulka 2. Seznam použitých chemikálií

Název	Výrobce/dodavatel
Agaróza	Sigma-Aldrich, USA
CTAB	Sigma-Aldrich, USA
dNTP	Thermo Scientific, USA
Etanol	Penta, Česká republika
Fenol	MP Biomedicals, USA
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific, USA
GoTaq® DNA polymeráza	Promega, USA
Chlorid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Chloroform	Lach-Ner, Česká republika
Isoamylalkohol	Penta, Česká republika
Isopropylalkohol	Penta, Česká republika
Octan sodný	Sigma-Aldrich, USA
PCR vkládací pufr Yellow load	Top-Bio, Česká republika
QX200™ ddPCR™ EvaGreen® supermix	Bio-Rad, USA
SYBR® Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, USA

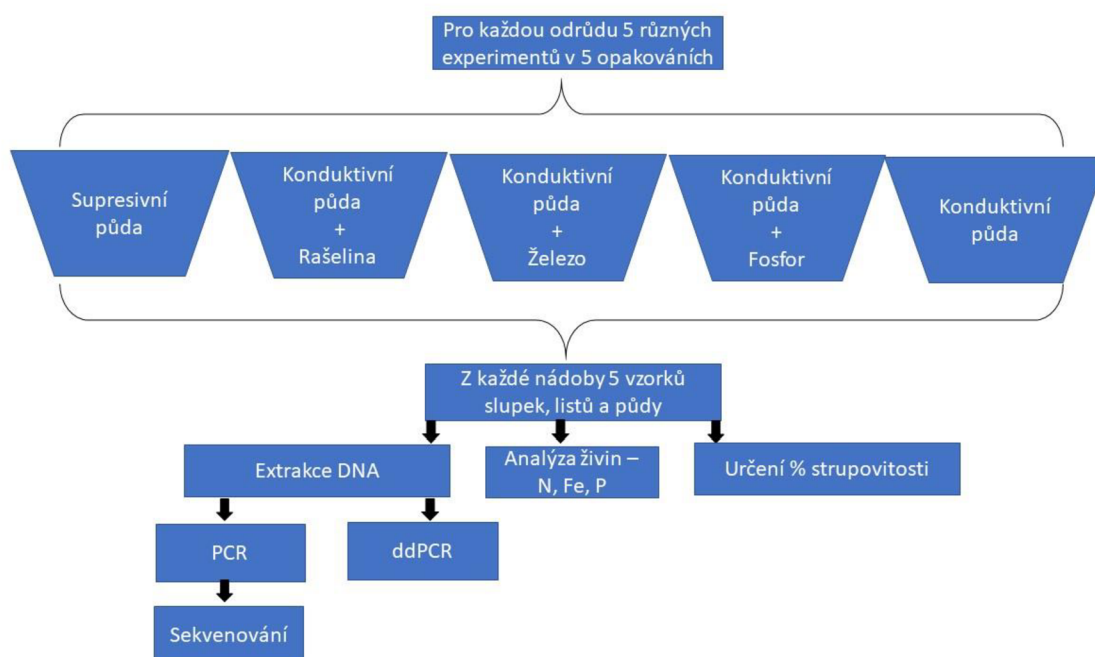
4.1.2 Pufry

Tabulka 3. Seznam a složení pufřů

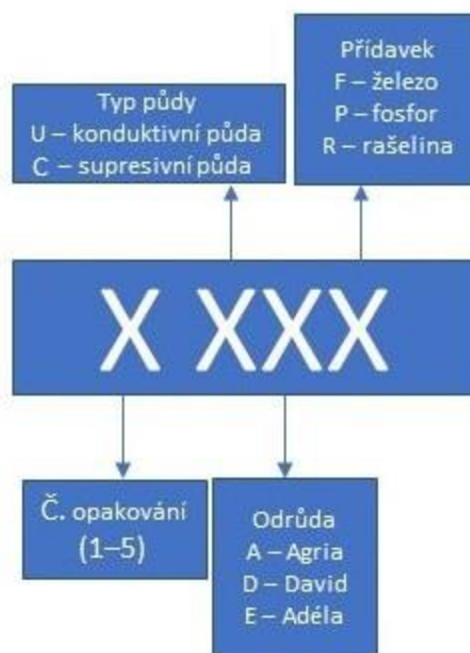
Pufr	Složení	Koncentrace
Müllerův pufr	NaH ₂ PO ₄ (pH8)	50 mM
	NaCl	50 mM
	Tris-HCl (pH 8)	500 mM
TAE	Tris-acetát	40 mM
	EDTA (pH 8)	1 mM
TE ⁻¹	Tris (pH 8)	10 mM
	EDTA (pH 8)	0,1 mM

4.1.3 Design experimentu

Byl proveden nádobový experiment, ve kterém se pracovalo se třemi odrůdami brambor. Jednalo se o odrůdy Agria, Adéla a David. Do každé nádoby o objemu 10 l byla přidána konduktivní půda a dále také vybrané živiny, u kterých se předpokládá, že zamezují rozvoji obecné strupovitosti brambor. Kontrolní sada nádob obsahovala supresivní půdu, která sloužila jako kontrolní pro supresivní efekt ošetření. Od každého ošetření bylo 5 nádob. V prvním ošetření byla konduktivní půda obohacena o rašelina (2,5 l/nádoba). Rašelina snižovala pH půdy, zvyšovala obsah železa a minerálních látek. V druhém ošetření bylo přidáno železo v chelátované formě (Fe-DTPA, 10,72 ml/nádoba) a do čtvrté fosfor (KH₂PO₄, 30,76 g/nádoba). Poslední nádoba obsahovala samotnou konduktivní půdu, která sloužila ke kontrole bez ošetření. Z každé nádoby byly odebrány vzorky půdy, peridermu z hlíz brambor a listů z bramborových rostlin. Na každé hlíze se hodnotila závažnost strupovitosti pomocí stupnice s devíti stupni založených na procentu povrchu pokrytého lézemi (Wenzl & Demel, 1967). Každému vzorku byl přiřazen kód podle typu ošetření (Obr. 4). Půda byla skladována při -80 °C v 2 ml eppendorfkách, periderm se skladoval v centrifugačních zkumavkách o velikosti 50 ml, které byly uchovávány při teplotě -20 °C. Analýza se prováděla ze 75 vzorků, kde z každého vzorku peridermu a listu byl stanoven obsah dusíku, železa a fosforu. Chemickou analýzu provedla firma Aquatest, a.s. standardními metodami. Následně se ze vzorků peridermu extrahovala DNA.



Obr. 3 Design experimentu



Obr. 4 Kód vzorku

4.2 Metody

4.2.1 Extrakce DNA z bramborových slupek

Extrakce DNA byla provedena podle protokolu Ságová-Marečková *et al.* (2008). Do šroubovacích zkumavek o objemu 2 ml bylo naváženo 250 mg skleněných kuliček o průměru 0,1 mm a 250 mg skleněných kuliček o průměru 0,5 mm. Po sterilizaci zkumavek do nich bylo naváženo 3 g bramborového peridermu. Před přidáním do zkumavek byl periderm nakrájen skalpelem sterilovaným etanolem na malé kousky o velikosti přibližně 2x2 mm.

Následně bylo ke vzorkům přidáno 600 μ l Müllerova extrakčního pufru a 300 μ l směsi fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 25:24:1. Zkumavky byly vloženy do mlýnku 3110 BX Mini-BeadBeater-1 (BioSpec Products, USA), v němž byly buňky homogenizovány při 2400 kmitech po dobu 1 minuty a 30 sekund. Poté byly zkumavky vloženy do centrifugy Eppendorf Centrifuge 5418 (Eppendorf, Německo), kde došlo k odstředění po dobu 2 minut při 12 000 rpm. Vzniklý supernatant byl odebrán do čistých zkumavek o objemu 2 ml. Do původních šroubovacích zkumavek bylo přidáno 300 μ l Müllerova extrakčního pufru a tyto zkumavky byly opět vloženy do mlýnku na dobu 30 sekund. Poté byly vzorky odstředěny v centrifuze při 12 000 rpm po dobu 2 minut. Vzniklý supernatant byl přidán do zkumavek se supernatantem z předešlého kroku. Tento mix supernatantů byl vložen do centrifugy a došlo

k odstředění po dobu 2 minut při 12 000 rpm. Poté byl supernatant odebrán do čisté 2 ml zkumavky.

K supernatantu byl přidán fenol a chloroform v objemu stejném, jako byl supernatant v poměru 1:1. Vzorky byly důkladně promíchány a centrifugovány 5 minut při 6000 rpm, poté byl odebrán supernatant do čistých 2 ml zkumavek. K supernatantu byl přidán chloroform ve stejném množství jako byl objem supernatantu. Vzorky byly důkladně promíchány a centrifugovány 5 minut při 6000 rpm. Vzniklý supernatant byl odebrán do čistých 2 ml zkumavek a zahříván na 65 °C v termobloku Bio TDB-100 (Biosan, Lotyšsko) po dobu 5 minut.

K ohřátému supernatantu byl přidán 5M roztok chloridu sodného na výslednou koncentraci 1,5 M a 10% CTAB (předehřáté ve vodní lázni) na výslednou koncentraci 1 %. Roztoky ve zkumavkách byly promíchány a inkubovány po dobu 30 minut v termobloku při 65° C. Po této době došlo k ochlazení vzorků pod tekoucí vodou o teplotě 20 °C.

Do zkumavek byl přidán chloroform o stejném objemu jako byl objem mixu ve zkumavce. Zkumavky se centrifugovaly při 4500 rpm po dobu 15 minut, poté byl odebrán supernatant. Pro vysrážení DNA v roztoku byl do supernatantu přidán 3M octan sodný (pH 5) v objemu 10 % a isopropanol v 60 % objemu. Obsah zkumavek byl promíchán a inkubován při laboratorní teplotě 20–30 minut. Poté byly centrifugovány v předchlazené centrifuzě na 4 °C Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Německo) 20 minut při 10 000 rpm. Po centrifugaci byl vzniklý supernatant vylitý, DNA peleta tedy byla odstředěna na dně eppendorfky a do zkumavky bylo přidáno 50 µl mraženého etanolu. Zkumavky byly opět centrifugovány ve vychlazené centrifuzě na 4 °C při 10 000 rpm po dobu 5 minut. Etanol byl vylitý a vzniklá DNA peleta se sušila ve vakuovém koncentrátu CentriVap (Labconso, USA) při teplotě 40 °C po dobu 15 minut. Po kompletním vysušení byla DNA peleta promyta 50 µl 10 mM TRIS a inkubována v termobloku při 65 °C. Následovalo přečištění DNA pomocí kitu GeneRead™ Size Selection Kit (Qiagen, Nizozemí).

Přečištění DNA bylo provedeno podle protokolu výrobce. K inkubované DNA bylo přidáno 40 % objemu pufru SB₁ Buffer a obsah zkumavky byl přepipetován do kolonky MinElute. Kolonky byly centrifugovány 1 minutu při 11 000 rpm. Po centrifugaci byl obsah zkumavky pod kolonkou, na které byla přichycena DNA, vylit a kolonka se vrátila do stejné zkumavky.

Poté bylo přidáno 700 µl 80% etanolu a opět proběhla centrifugace po dobu 1 minuty při 11 000 rpm. Obsah zkumavky byl odstraněn. Tento krok byl opakován 1x. Kolonky byly centrifugovány naprázdno, aby došlo k důkladnému odstranění etanolu z DNA. Po centrifugaci byly kolonky vloženy do čistých zkumavek a bylo do

nich napipetováno 25 μl pufru Buffer EB. Proběhla inkubace při laboratorní teplotě 1 minutu a následovala centrifugace při 11 000 rpm po dobu 1 minuty. Opět došlo k přidání 25 μl pufru a k inkubaci po dobu 1 minuty a následné centrifugaci. Tímto byla DNA uvolněna do zkumavek a následně byla skladována při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2 Polymerázová řetězová reakce

PCR (Polymerase Chain Reaction) reakce probíhali v termocykléru C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Pro PCR se používala GoTaq® DNA polymeráza, složení směsi je uvedeno v tabulce 3. Množství DNA vstupující do reakce bylo voleno na základě koncentrace DNA vypočtené z gelu. Celkový objem směsi činil 25 μl .

Tabulka 4. Reakční směs pro PCR

Složka	Objem pro 1 reakci
Pufr	5 μl
DMSO	1,25 μl
GoTag polymeráza	0,125 μl
Forward primer	1 μl
Reverse primer	1 μl
MgCl ₂	4 μl
dNTP	0,5 μl
dH ₂ O	11, 125 μl (na 1 μl DNA)
DNA	1-5 μl

Podmínky amplifikace byly závislé na použitých primerech (Tabulka 4). Koncentrace primerů vstupujících do reakce byla 10 μM , této koncentrace bylo dosaženo naředěním zásobního roztoku o koncentraci 100 $\mu\text{M TE}^{-1}$ pufrém. Celý průběh PCR byl v obou chodech stejný (Tabulka 5), rozdíl byl jen v teplotě annealingu a v počtu cyklů. V prvním PCR byla teplota annealingu nastavena na $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ a bylo zařazeno celkově 14 cyklů. Do druhého chodu PCR se přidávaly 2 μl PCR produktu z předchozího chodu. Teplota annealingu byla $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ a bylo zařazeno 20 opakování.

Tabulka 5. Primery

Primer	Sekvence	Zdroj
16Seu27f	5'-AGAGTTTGATCMTGGCKCAG-3'	Čermák et al. (2008)
783r-aL	5'-CTACCAGGGTATCTAATCCTG-3'	Sakai et al. (2004)
783r-bL	5'-CTACCGGGGTATCTAATCCCG-3'	Sakai et al. (2004)

783r-cL	5'-CTACCCGGGTATCTAATCCGG-3'	Sakai et al. (2004)
CS1 515pF	5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'	Caporaso et al. (2010)
CS2 806aR	5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'	Caporaso et al. (2010)

Tabulka 6. Průběh PCR

Krok	Teplota	Čas	Opakování
Denaturace	95 °C	5 min	1x
Denaturace	95 °C	30 s	14x/20x
Annealing	56 °C /55 °C	45 s	
Elongace	72 °C	45 s	
Elongace	72 °C	5 min	1x

4.2.3 Elektroforéza

Elektroforéza sloužila k ověření správnosti extrakce DNA a PCR reakcí. Probíhala v agarózovém gelu, kdy k přípravě 1% gelu bylo použito 0,5 g agarózy a 50 ml TAE pufru. Agaróza se rozpouštěla v mikrovlnné troubě po dobu zhruba 1 minuty. Poté následovalo ochlazení agarózy na 55 °C pod tekoucí vodou. Po ochlazení se k agaróze přidalo 5 µl barviva SYBR® Safe DNA Gel Stain, jež bylo před použitím naředěno v DMSO v poměru 1:9. Poté byla agaróza nalita do formy, ve které byl umístěn elektroforézový hřebínek. Roztok se po nalití do formy nechal stát při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Poté byl ztuhlý gel ponořen do TAE pufru v elektroforézové vaničce. Po odstranění hřebenu vznikly jamky, do kterých se nanášely 2 µl DNA nebo 2 µl PCR produktu smíchané s 2 µl pufru Yellow load. Do první jamky bylo nanášeno 5 µl DNA Ladder, sloužící k odhadnutí délky a množství fragmentů DNA ve vzorku. Po nanesení vzorků do gelu byla zapnuta elektroforéza při konstantním napětí 100 V a proudu 95 mA a probíhala přibližně 20 minut. Gel byl detekován pod UV světlem a snímek gelu byl pořízen pomocí programu GeneSnap 7.12.

4.2.4 Analýza živin

Periderm z hlíz na analýzu živin byl odvážen na Petriho misky v přibližném množství 5 g. Takto připravené vzorky se sušily v laboratorní sušárně UNB 200 (memmert, Německo) při teplotě 200 °C přibližně 4 hodiny. Po úplném vysušení peridermu a listů následovalo vážení vzniklé sušiny a balení vzorků do papírových sáčků, které byly následně odeslány k analýze do Botanického ústavu AV ČR

v Třeboni. Pro stanovení celkového fosforu bylo 20 mg sušených bramborových listů postupně rozloženo pomocí HNO_3 a HClO_4 . V mineralizovaných vzorcích byly dusík a fosfor stanoveny průtokovou injekční analýzou se spektrofotometrickou detekcí pomocí analyzátoru FIA Lachat QC 8500 (Lachat Instruments, Hach Company, Loveland). Obsah železa v listech brambor byl stanoven atomovou absorpční spektrometrií pomocí AAS spektrometru ContrAA 700 (Analytik Jena, Jena, Německo) po mineralizaci kyselinou nitro-chlorovodíkovou.

4.2.5 Sekvence

PCR produkty byly napipetovány do 96 jamkové destičky a byly odeslány k MiSeq sekvenaci (University of Illinois, Chicago). Sekvence byla provedena na sekvenátoru MiSeq (Illumina; San Diego, USA), kde na základě SBS technologie probíhá masivní sekvenování milionů fragmentů za pomoci reverzibilního terminátoru.

Výsledný pár sekvencí byl sloučen, následně filtrován a zarovnán pomocí referenčního zarovnání z databáze Silva55. Sekvence se filtrovaly například od příliš krátkých fragmentů či eukaryot. Knihovna sekvencí se pomocí softwaru Usearch 10.0.24021 následně seskupila do tzv. operational taxonomic units (OTU). Zde se vytvořily klastry, které jsou si podobné z více než 97 %. Tyto klastry byly dále taxonomicky řazeny, tzn. že sekvence byly porovnávány s již vytvořenou databází. Taxonomické přiřazování knihoven bylo provedeno v Mothuru 1.39.564. Sekvence plastidů, mitochondrií a dalších, které nejsou v doméně *Bacteria*, byly odstraněny. Distanční matice popisující rozdíly ve složení komunity mezi jednotlivými vzorky byly vypočteny pomocí Yue-Clayton. Analýza molekulární variace (AMOVA) byla založena na matici vzdálenosti Yue-Clayton. Pomocí Non-metric multidimensional scaling (NMDS) bylo znázorněno, jak se celková bakteriální společenstva od sebe liší v jednotlivých opatřeních.

4.2.6 LDA Effect Size (LEfSe)

LEfSe je algoritmus pro objevení a vysvětlení vysokorozměrných biomarkerů, které identifikují genomické rysy (geny, dráhy, taxony), charakterizující rozdíly mezi dvěma nebo více biologickými stavy. Má statistickou významnost i biologickou relevanci. Umožňuje identifikovat odlišně hojně rysy, které se mezi biologickými třídami statisticky liší. Následným testováním se zjistí, zda jsou tyto rozdíly v souladu s očekávaným biologickým chováním. Nejprve se určuje neparametrický faktoriál Kruskal-Wallis k detekci prvků s významnou rozdílnou četností s ohledem na

zájmovou třídu. Biologická významnost je zkoumána pomocí sady párových testů pomocí (nepárovaného) Wilcoxonova testu. Jako poslední krok používá LEfSe lineární diskriminační analýzu k odhadu velikosti účinku každého rozdílně hojného prvku (Segata et al., 2011).

5 Výsledky

V první části této kapitoly je zhodnocena závažnost aktinobakteriální obecné strupovitosti u jednotlivých odrůd. Druhá část pojednává o živinovém složení peridermu a listů rostlin. V poslední části je uvedeno složení mikrobiálního společenstva v bramborových slupkách v závislosti na podmínkách prostředí.

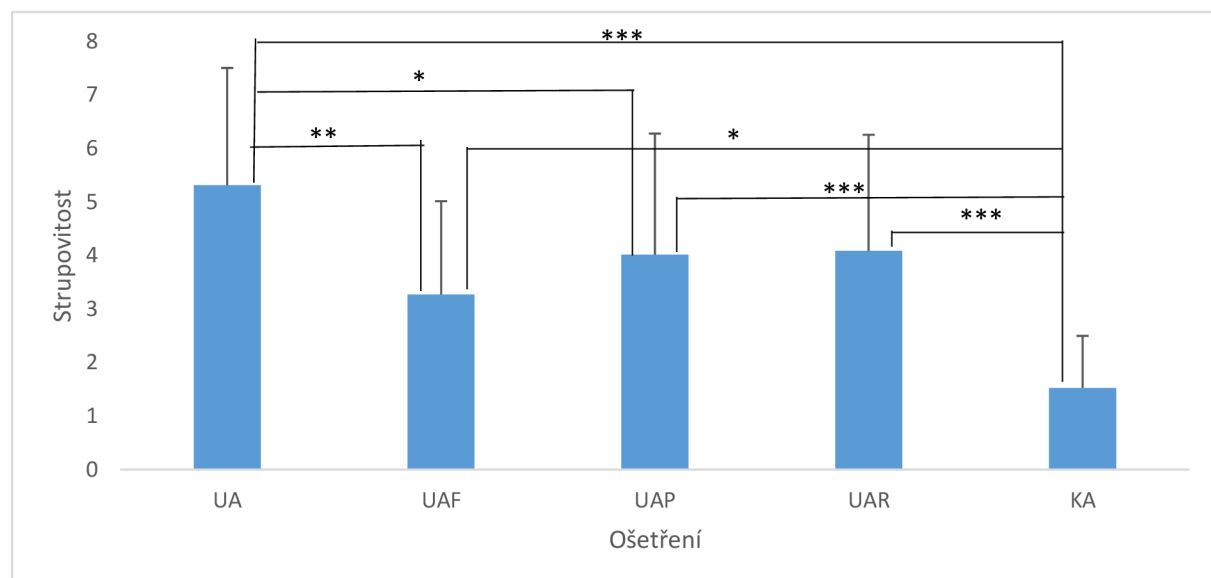
5.1 Aktinobakteriální obecná strupovitost u vybraných odrůd

Aktinobakteriální obecná strupovitost byla hodnocena u odrůd Agria, David a Adéla. Signifikantní rozdíly mezi jednotlivými ošetřeními byly pozorovány u odrůdy Agria a David, zatímco odrůda Adéla nevykazovala žádnou rozdílnost v tomto parametru (Tabulka 7).

Tabulka 7. Srovnání strupovitosti mezi odrůdami ve všech ošetřeních, statistická významnost (p) podle analýzy Kruskal-Wallis pro všechny odrůdy

Odrůda	David	Agria	Adéla
Strupovitost	0,054	0,011	0,010

5.1.1 Strupovitost u odrůdy Agria



Obr. 5 Srovnání strupovitosti u odrůdy Agria pro jednotlivá ošetření

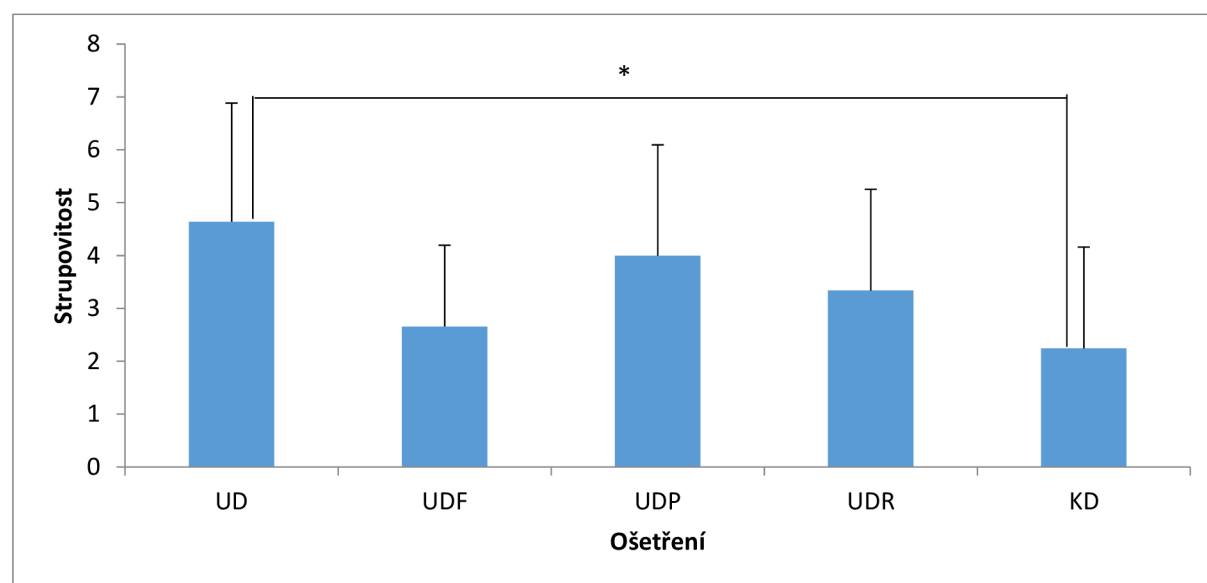
Nejvyšší strupovitost u odrůdy Agria vykazovala kontrolní konduktivní půda. Naopak nejnižší výskyt strupovitosti byl u supresivní půdy.

U odrůdy Agria byly prokázány signifikantní rozdíly v úrovni strupovitosti mezi jednotlivými ošetřeními (Tabulka 7). Hlízy ze supresivní půdy měly signifikantně nižší strupovitost než všechna další ošetření. Signifikantně nižší strupovitost než konduktivní půda měla také ošetření železem a fosforem (Tabulka 8).

Tabulka 8. Srovnání statistické významnosti (p) analýzy Tukeyův test pro odlišná ošetření odrůdy Agria

	UA	UAR	UAF	UAP	KA
UA		0,089	0,003	0,029	0,0001
UAR	0,089		0,434	0,979	0,0003
UAF	0,003	0,434		0,744	0,019
UAP	0,029	0,979	0,744		0,0008
KA	0,0001	0,0003	0,019	0,001	

5.1.2 Strupovitost u odrůdy David



Obr. 6 Srovnání strupovitosti u odrůdy David pro jednotlivá ošetření

Největší strupovitost u odrůdy David vykazovala konduktivní půda. Naopak nejnižší výskyt strupovitosti byl u supresivní půdy.

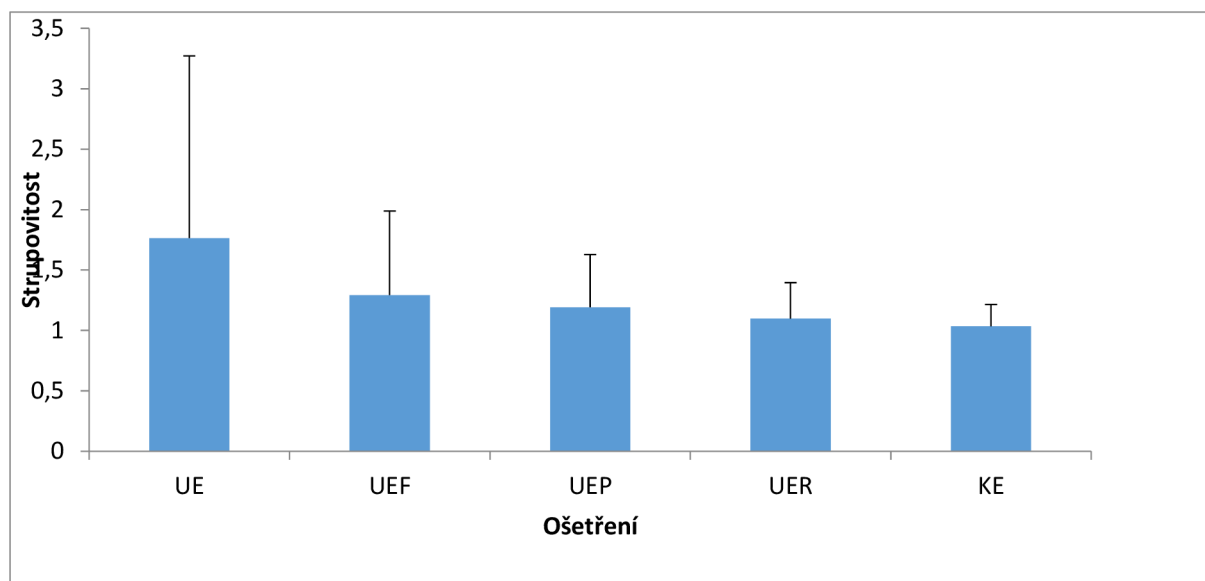
Hlízy z konduktivní půdy měly signifikantně vyšší strupovitost než hlízy ze supresivní půdy.

Tabulka 9. Srovnání statistické významnosti (p) analýzy Tukeyův test pro odlišná ošetření u odrůdy David

	UD	UDR	UDF	UDP	KD

UD		0,652	0,330	0,983	0,049
UDR	0,652		0,978	0,916	0,497
UDF	0,330	0,978		0,632	0,823
UDP	0,983	0,916	0,632		0,138
KD	0,049	0,497	0,823	0,138	

5.1.3 Strupovitost u odrůdy Adéla



Obr. 7 Strupovitost u odrůdy Adéla pro jednotlivá ošetření

Nejvyšší strupovitost u odrůdy Adéla vykazovala konduktivní půda. Nejnižší výskyt strupovitosti byl u hlíz ze supresivní půdy.

Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi jednotlivými ošetřeními.

5.2 Analýza živin v peridermu brambor

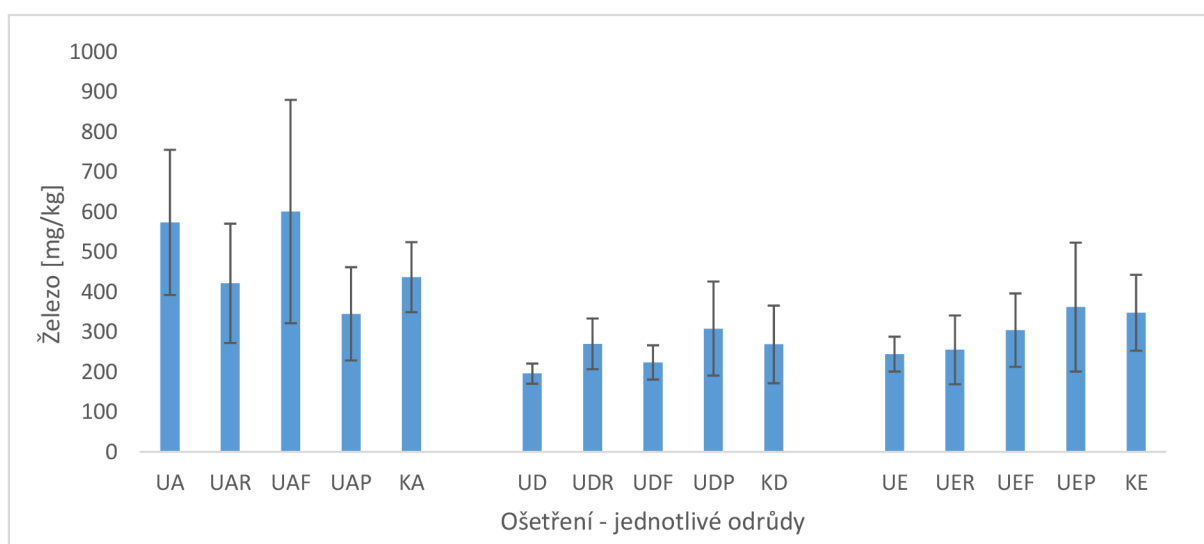
Analýza živin v peridermu byla provedena u odrůd Agria, David a Adéla. Analyzovány byly tři prvky – železo, dusík a fosfor.

Signifikantně vyšší obsah fosfru byl zjištěn u odrůd Agria a David (Tabulka 10).

Tabulka 10. Statistická významnost (p) analýzy živin v peridermu Kruskal-Wallis pro všechny odrůdy

	David	Agria	Adéla
Železo	0,261	0,357	0,625
Dusík	0,485	0,143	0,572
Fosfor	0,005	0,023	0,417

5.2.1 Obsah železa



Obr. 8 Celkový obsah železa [mg/kg] u jednotlivých odrůd a ošetření

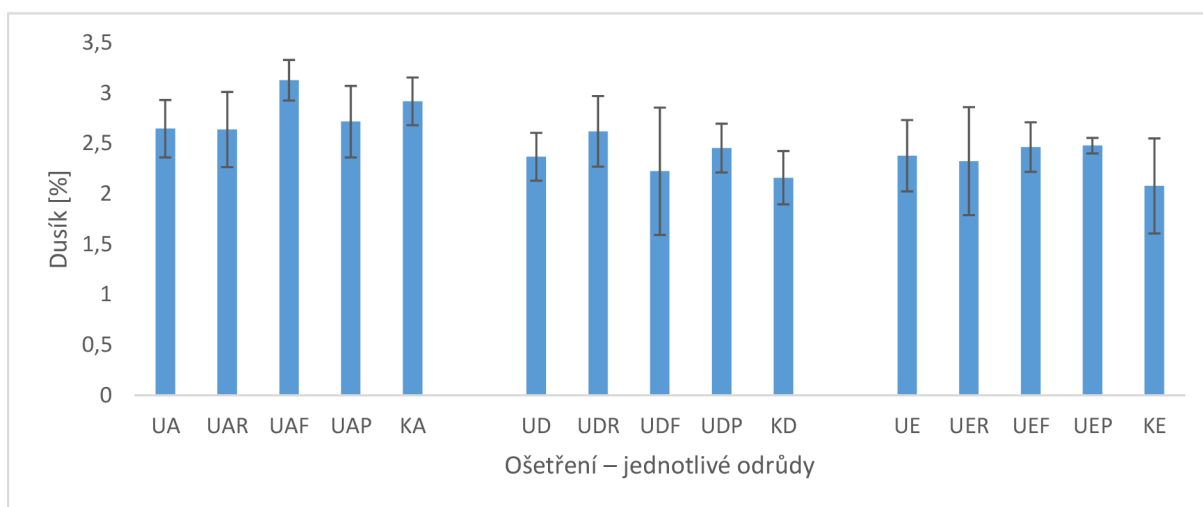
Kruskal-Wallis ANOVA neprokázala žádné signifikantní rozdíly mezi testovanými ošetřeními u jednotlivých odrůd (Tabulka 10).

Celkově nejvyšší obsah dostupného železa v peridermu byl zaznamenán u odrůdy Agria. Nejvyšší obsah železa byl zjištěn v konduktivní půdě ošetřené železem. Nejméně železa obsahoval periderm v konduktivní půdě ošetřené fosforem.

Obsah železa v peridermu u odrůdy David byl nejvyšší v konduktivní půdě ošetřené fosforem. Nejméně železa bylo v hlízách z konduktivní půdy.

Odrůda Adéla měla nejvyšší obsah železa v konduktivní půdě ošetřené fosforem. Nejméně železa bylo obsaženo v peridermu z konduktivní půdy.

5.2.2 Obsah dusíku



Obr. 9 Celkový obsah dusíku [%] u jednotlivých odrůd a ošetření

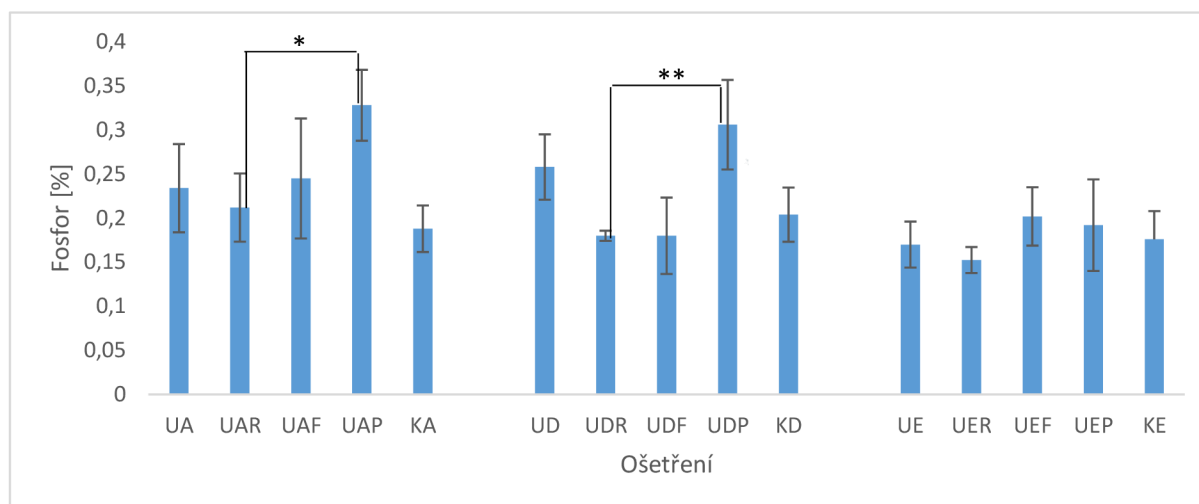
Kruskal-Wallis ANOVA neprokázala žádné signifikantní rozdíly mezi testovanými ošetřeními u jednotlivých odrůd (Tabulka 10).

Analýzou živin byl naměřen ve všech odrůdách přibližně stejný procentuální obsah dusíku. Avšak nejvyšší obsah dusíku byl zaznamenán u odrůdy Agria. U této odrůdy bylo nejvíce dusíku v peridermu z konduktivní půdy ošetřené železem. Hlízy z konduktivní půdy, konduktivní půdy ošetřené rašelinou a konduktivní půdy ošetřené fosforem měly podobný obsah dusíku.

U odrůdy David byl nejvyšší obsah dusíku v konduktivní půdě ošetřené rašelinou. Nejméně dusíku bylo obsaženo v hlízách ze supresivní půdy.

Procentuální zastoupení dusíku u odrůdy Adéla bylo nejvyšší v peridermu z konduktivní půdy ošetřené fosforem. Naopak nejméně dusíku obsahovaly hlízy ze supresivní půdy.

5.2.3 Obsah fosforu



Obr. 10 Celkový obsah fosforu [%] u jednotlivých odrůd a ošetření

Kruskal-Wallis ANOVA prokázala signifikantně nižší rozdíly u odrůd Agria a David (Tabulka 10). U obou odrůd byl v hlízách z konduktivní půdy ošetřené rašelinou signifikantně nižší obsah fosforu než v hlízách z konduktivní půdy ošetřené fosforem (Tabulka 11, 12).

Odrůda Agria měla nejvyšší procentuální zastoupení fosforu v peridermu u konduktivní půdy ošetřené fosforem. Nejméně fosforu bylo zastoupeno v hlízách ze supresivní půdy.

U odrůdy David byl nejvyšší obsah fosforu v peridermu z konduktivní půdy ošetřené fosforem. Naopak nejméně fosforu bylo obsaženo v hlízách z konduktivní půdy ošetřené rašelinou a konduktivní půdy ošetřené železem.

U odrůdy Adéla byl nejvyšší obsah fosforu v peridermu z konduktivní půdy ošetřené železem. Nejméně fosforu bylo obsaženo v hlízách z konduktivní půdy ošetřené rašelinou.

Tabulka 11. Statistická významnost (p) analýzy Tukeyův test pro odlišná ošetření u odrůdy David

	UD	UDR	UDF	UDP	KD
UD		0,052	0,052	0,384	0,275
UDR	0,052		1	0,001	0,887
UDF	0,052	1		0,001	0,887
UDP	0,384	0,001	0,001		0,007
KD	0,275	0,887	0,887	0,007	

Tabulka 12. Statistická významnost (p) analýzy Tukeyův test pro odlišná ošetření u odrůdy Agria

	UA	UAR	UAF	UAP	KA
UA		0,959	0,998	0,063	0,625
UAR	0,959		0,870	0,015	0,944
UAF	0,998	0,870		0,155	0,483
UAP	0,063	0,015	0,155		0,003
KA	0,625	0,944	0,483	0,003	

5.3 Analýza živin v listech brambor

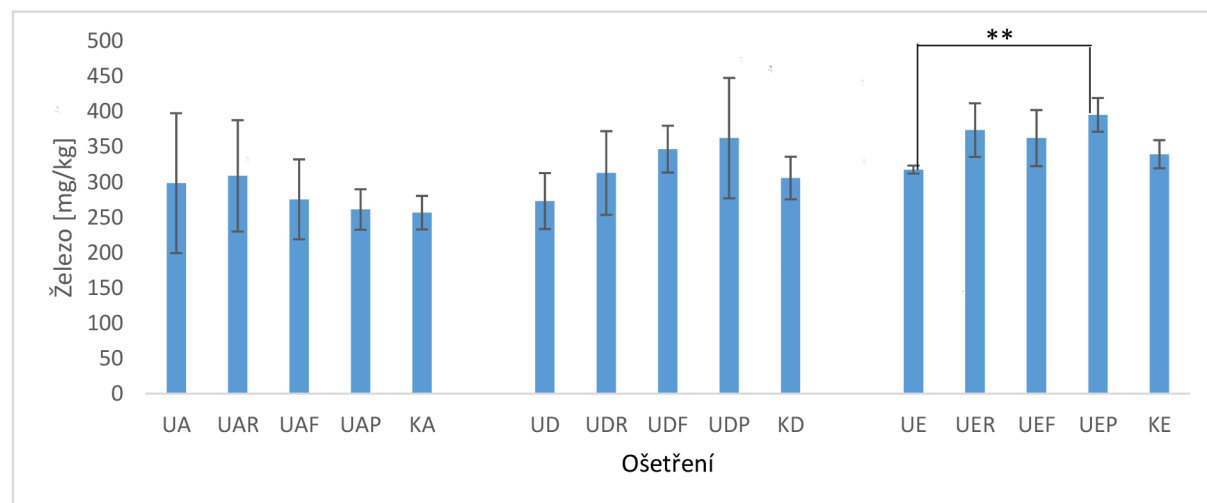
Analýza živin v listech byla provedena u odrůd Agria, David a Adéla. Analyzovány byly tři prvky – železo, dusík a fosfor.

Signifikantně nižší byl obsah dusíku v listech z konduktivní půdy u odrůdy Agria. Odrůda Adéla měla signifikantně nižší obsah železa v listech z konduktivní půdy.

Tabulka 13. Statistická významnost (p) analýzy živin v listech Kruskal-Wallis pro všechny odrůdy

	David	Agria	Adéla
Železo	0,122	0,790	0,017
Dusík	0,068	0,041	0,666
Fosfor	0,070	0,231	0,363

5.3.1 Obsah železa



Obr. 11 Celkový obsah železa [mg/kg] v listech u jednotlivých odrůd a ošetření

Kruskal-Wallis ANOVA prokázala signifikantně nižší obsah železa u odrůdy Adéla v listech konduktivní půdy oproti listům z konduktivní půdy ošetřené fosforem (Tabulka 14). Odrůda Adéla měla v listech nejmenší obsah železa v konduktivní půdě. Nejvyšší obsah železa v listech byl v konduktivní půdě s přidavkem fosforu.

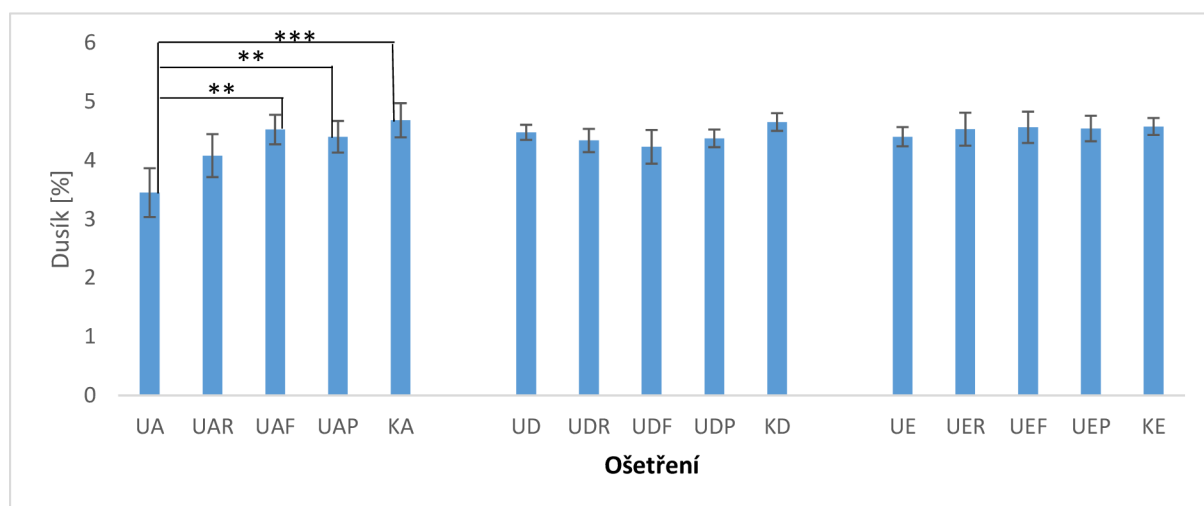
Obsah železa v listech u odrůdy Agria byl nejvyšší v konduktivní půdě s přidavkem rašeliny. Přídavek železa do konduktivní půdy neměl vliv na zvýšení obsahu železa v listech, jelikož listy z kontrolní konduktivní půdy obsahovaly více železa.

U odrůdy David byl nejvyšší obsah železa v listech z konduktivní půdy obohacené o fosfor. Celkový obsah železa v listech byl ovlivněn přidavkem železa do konduktivní půdy, jelikož obsah železa u tohoto opatření byl vyšší než v samotné konduktivní půdě.

Tabulka 14. Statistická významnost (p) analýzy železa Tukeyův test v listech pro odlišná ošetření u odrůdy Adéla

	UE	UER	UEF	UEP	KE
UE		0,099	0,205	0,008	0,808
UER	0,099		0,982	0,841	0,499
UEF	0,205	0,982		0,480	0,776
UEP	0,008	0,841	0,480		0,073
KE	0,808	0,499	0,776	0,073	

5.3.2 Obsah dusíku



Obr. 12 Celkový obsah dusíku [%] v listech u jednotlivých odrůd a ošetření

Kruskal-Wallis ANOVA prokázala signifikantně nižší obsah dusíku v listech z konduktivní půdy oproti ostatním ošetřením včetně supresivní půdy u odrůdy Agria (Tabulka 15).

Procentuální zastoupení dusíku bylo velmi podobné u všech tří testovaných odrůd. U odrůdy Adéla bylo nejvíce dusíku zjištěno v listech ze supresivní půdy. Avšak velmi podobných hodnot dosahoval dusík v listech u všech ošetření konduktivní půdy. Nejméně zastoupený dusík v listech byl v konduktivní půdě.

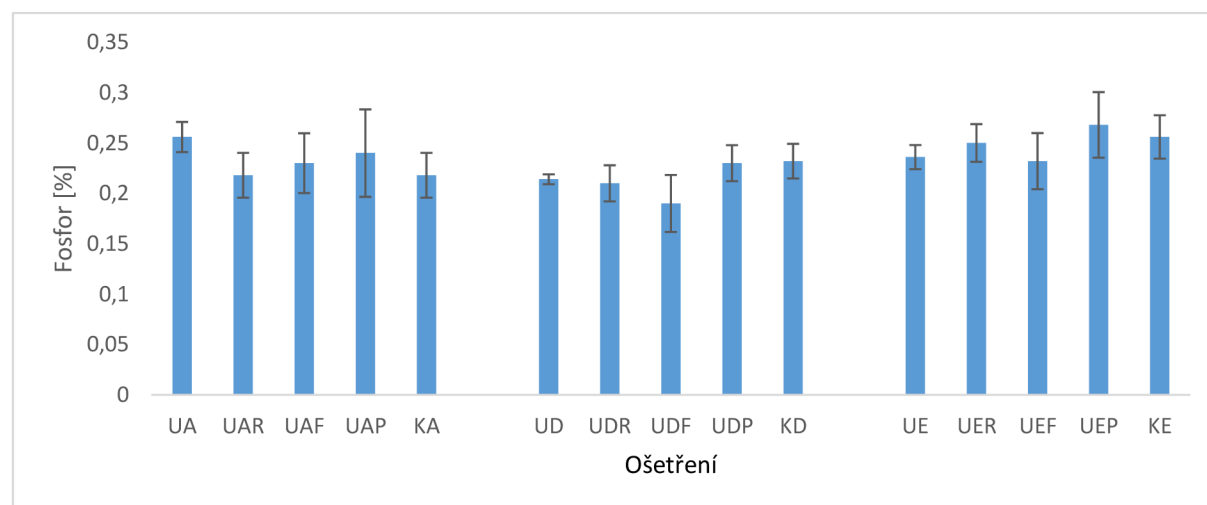
Odrůda David měla v listech podobné zastoupení dusíku jako odrůda Adéla. Nejvyšší množství dusíku bylo v listech ze supresivní půdy. Naopak nejméně dusíku obsahovaly listy z konduktivní půdy s přidavkem železa.

Odrůda Agria měla stejně jako předchozí odrůdy nejvíce dusíku obsaženého v listech ze supresivní půdy. Naopak nejméně dusíku bylo obsaženo v listech z konduktivní půdy.

Tabulka 15. Statistická významnost (p) analýzy dusíku Tukeyův test v listech pro odlišná ošetření u odrůdy Agria

	UA	UAR	UAF	UAP	KA
UA		0,082	0,001	0,004	0,0004
UAR	0,082		0,331	0,632	0,103
UAF	0,001	0,331		0,983	0,957
UAP	0,004	0,632	0,983		0,740
KA	0,0004	0,103	0,957	0,740	

5.3.3 Obsah fosforu



Obr. 13 Celkový obsah fosforu [%] v listech u jednotlivých odrůd a ošetření

Kruskal-Wallis ANOVA neprokázala žádné signifikantní rozdíly mezi testovanými ošetřeními u jednotlivých odrůd (tabulka 13).

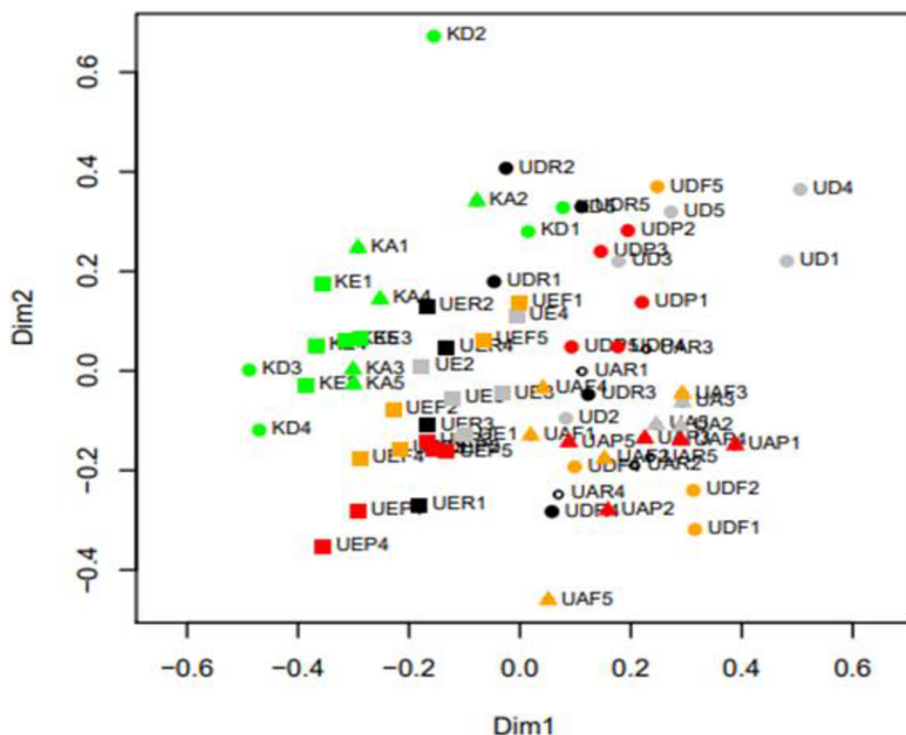
Procentuální zastoupení fosforu v listech bylo u všech odrůd velmi podobné pro všechna testovaná opatření. Odrůda Agria měla nejvyšší obsah fosforu v listech z konduktivní půdy. Vysoký obsah byl i v listech z konduktivní půdy ošetřené

fosforem či železem. Nejméně fosforu v listech bylo zjištěno u ošetření konduktivní půdy rašelinou a u listů ze supresivní půdy.

Odrůda David obsahovala nejvíce fosforu obsaženo v listech ze supresivní půdy a konduktivní půdy ošetřené fosforem. Naopak nejméně fosforu bylo obsaženo v listech z konduktivní půdy ošetřené železem.

U odrůdy Adéla byl nejvyšší obsah fosforu v listech z konduktivní půdy ošetřené fosforem. Nejméně fosforu bylo obsaženo v listech v kontrolní konduktivní půdě.

5.4 Bakteriální společenstva



Obr. 14 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) – srovnání bakteriálních společenstev mezi odrůdami, Agria (trojúhelník), Adéla (čtverec), David (kruh) a ošetřeními supresivní půda (zelená), konduktivní půda (šedá), konduktivní půda + železo (oranžová), konduktivní půda + fosfor (červená), konduktivní půda + rašelina (černá)

Analýzou AMOVA byly zjištěny signifikantní rozdíly ve složení bakteriálních společenstev mezi jednotlivým odrůdami v konduktivní půdě mezi odrůdou Agria a Adéla. Další statisticky významné odlišnosti byli mezi odrůdou David a Adéla (Tabulka 16).

Tabulka 16. Statistická významnost (F_s , p) analýzy AMOVA bakteriálního společenstva pro všechny odrůdy v konduktivní půdě

	UA	UD	UE
UA		2,49	3,47*
UD	2,49		2,71**
UE	3,47*	2,71**	

Statistická analýza AMOVA potvrdila statisticky významné rozdíly ve složení bakteriálního společenstva v konduktivní půdě ošetřené rašelinou. Konkrétně byla signifikantní rozdílnost mezi odrůdou Agria a Adéla (Tabulka 17).

Tabulka 17. Statistická významnost (F,p) analýzy AMOVA složení bakteriálního společenstva pro všechny odrůdy v konduktivní půdě s přidavkem rašeliny

	UAR	UDR	UER
UAR		1,74	3,93*
UDR	1,74		1,84
UER	3,93*	1,84	

Statistická analýza AMOVA potvrzuje, že jsou přítomny signifikantní rozdíly ve složení bakteriálního společenstva u hlíz z konduktivní půdy obohacené o železo (Tabulka 18). Signifikantní rozdíly byly mezi odrůdou Agria a Adéla. Statisticky významné výsledky byly také mezi odrůdami Adéla a David. Mezi odrůdou Agria a David nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdílnosti ve složení mikrobiálního společenstva.

Tabulka 18. Statistická významnost (Fs,p) analýzy AMOVA složení bakteriálního společenstva pro všechny odrůdy v konduktivní půdě obohacené o železo

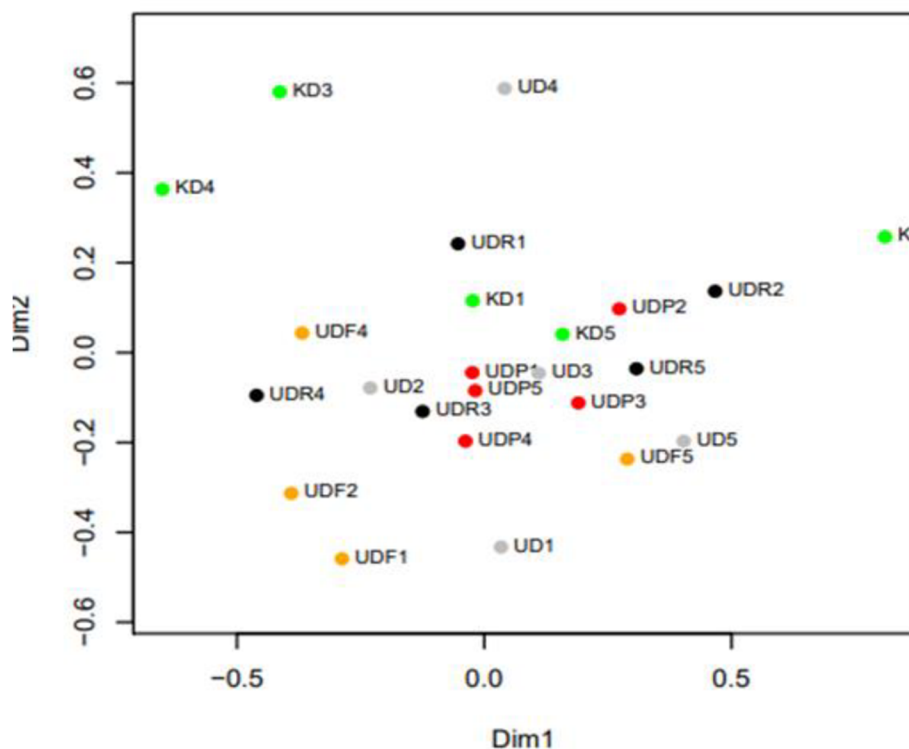
	UAF	UDF	UEF
UAF		1,00	2,38**
UDF	1,00		2,36**
UEF	2,38**	2,36**	

Posledním ošetřením bylo obohacení konduktivní půdy fosforem. Dle tabulky 19 byly u tohoto ošetření patrné odchylky ve složení bakteriálních společenstev mezi všemi odrůdami.

Tabulka 19. Statistická významnost (Fs,p) analýzy AMOVA pro všechny odrůdy v konduktivní půdě ošetřené fosforem

	UAP	UDP	UEP
UAP		3,84**	5,73**
UDP	3,84**		4,72**
UEP	5,73**	4,72**	

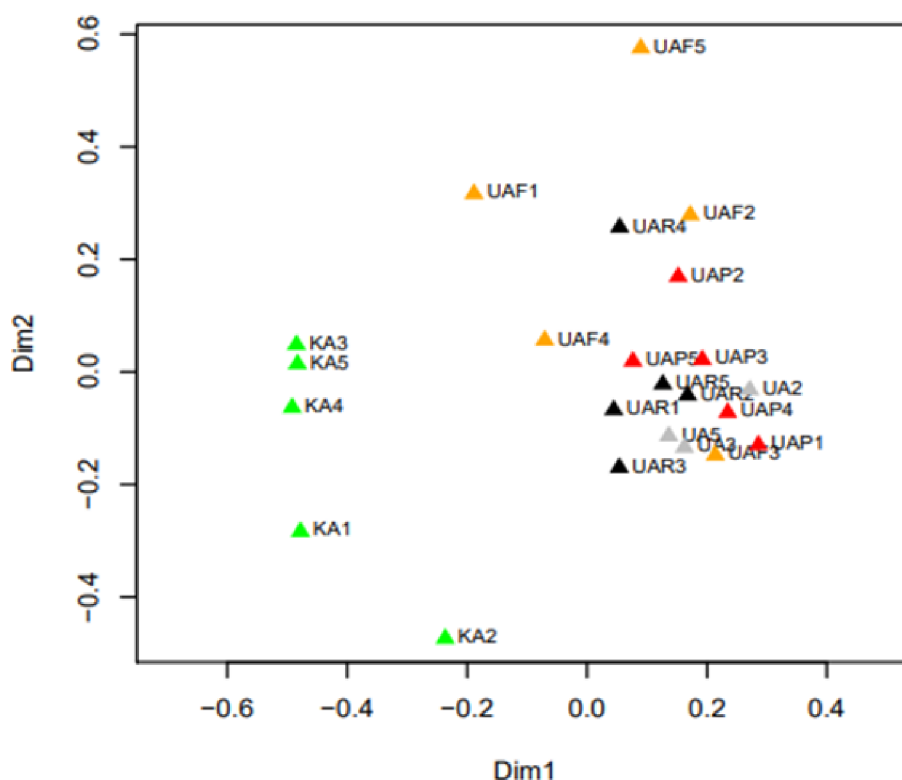
5.4.1 Bakteriální společenstva u odrůdy David



Obr. 15 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) – srovnání bakteriálních společenstev přítomných v peridermu u odrůdy David v konduktivní půdě (šedá), supresivní půdě (zelená), konduktivní půdě + železo (oranžová), konduktivní půdě + fosfor (červená), konduktivní půdě + rašelina (černá)

Dle statistického zhodnocení AMOVA neexistovala statistická významnost mezi žádným ošetřením u odrůdy David (AMOVA, $F_s = 1,08$, $p=0,05$).

5.4.2 Bakteriální společenstva u odrůdy Agria



Obr. 16 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) – srovnání bakteriálních společenstev přítomných v peridermu u odrůdy Agria v konduktivní půdě (šedá), supresivní půdě (zelená), konduktivní půdě + železo (oranžová), konduktivní půdě + fosfor (červená), konduktivní půdě + rašelina (černá).

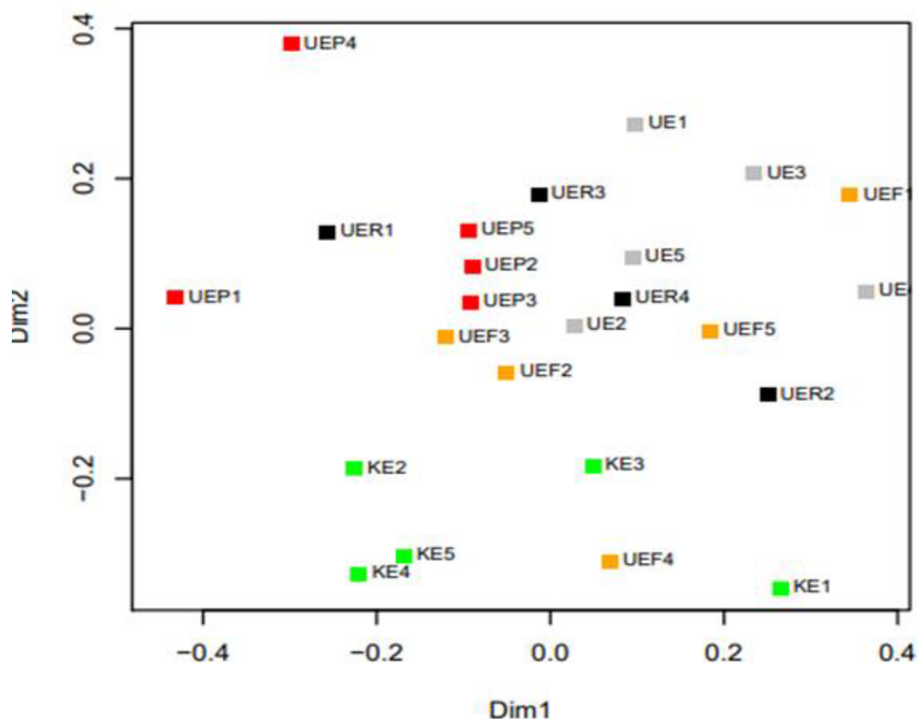
Hlízy z kontrolní konduktivní půdy u odrůdy Agria se svým bakteriálním společenstvem neodlišovaly od bakteriálních společenstev v hlízách z konduktivní půdy ošetřené železem a fosforem. Signifikantní rozdílnost byla pouze ve složení bakteriálního společenstva u hlíz z konduktivní půdy ošetřené železem a rašelinou.

Supresivní půda se složením společenstva odlišovala od kontrolní půdy i od všech dalších ošetření konduktivní půdy (AMOVA, $F_s=2,828$, $p=0,0001$).

Tabulka 20 Statistická významnost (F_s, p) analýzy AMOVA bakteriálních společenstev u odrůdy Agria pro daná ošetření

	UA	UAP	UAF	UAR
UA		1,31	1,81	1,3
UAP	1,31		1,99	1,22
UAF	1,81	1,99		1,73**
UAR	1,3	1,22	1,73**	

5.4.3 Bakteriální společenstva u odrůdy Adéla



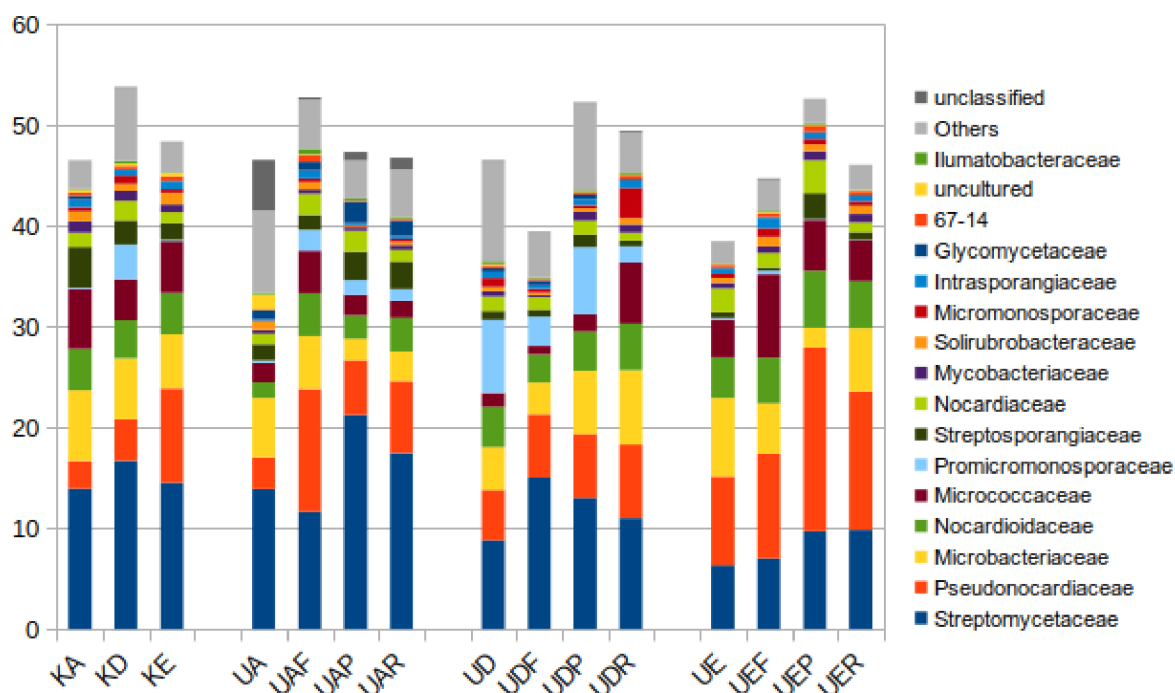
Obr. 17 Non-metric multidimensional scaling (NMDS) – srovnání bakteriálních společenstev přítomných v peridermuu odrůdy Adéla v konduktivní půdě (zelená), supresivní půdě (šedá), konduktivní půdě + fosfor (červená), konduktivní půdě + železo (oranžová), konduktivní půdě + rašelina (červená)

Hlízy z kontrolní konduktivní půdy se složením bakteriálního společenstva signifikantně odlišovaly od hlíz z konduktivní půdy ošetřené fosforem. Další signifikantní rozdílnost bakteriálního společenstva byla mezi hlízami z konduktivní půdy ošetřené fosforem a železem. Mezi ostatními případy nebyli nalezeny žádné statisticky významné odlišnosti ve složení bakteriálního společenstva.

Tabulka 21 Statistická významnost (F_s, p) analýzy AMOVA bakteriálních společenstev u odrůdy Adéla pro daná opatření

	UE	UEP	UEF	UER
UE		2,23**	1,26	1,19
UEP	2,23**		1,62**	1,38
UEF	1,26	1,62**		0,21
UER	1,19	1,38	0,21	

5.4.4 Taxonomické složení bakteriálních společenstev



Obr. 18 Zastoupení nejčastěji se vyskytujících čeledí z kmene aktinobakterií pro jednotlivá ošetření u odrůd Agria, David a Adéla

V supresivní půdě převažovaly aktinobakterie z čeledi *Streptomycetaceae*. Podobný výskyt byl zaznamenán také u hlíz z konduktivní půdy a všech dalších ošetření u odrůdy David. Odrůda Agria měla nejvyšší zastoupení *Streptomycetaceae* v hlízách z konduktivní půdy ošetřené fosforem. Kdežto v hlízách z konduktivní půdy ošetřené železem stejně jako u odrůdy Adéla převažoval výskyt *Pseudonocardiaceae*.

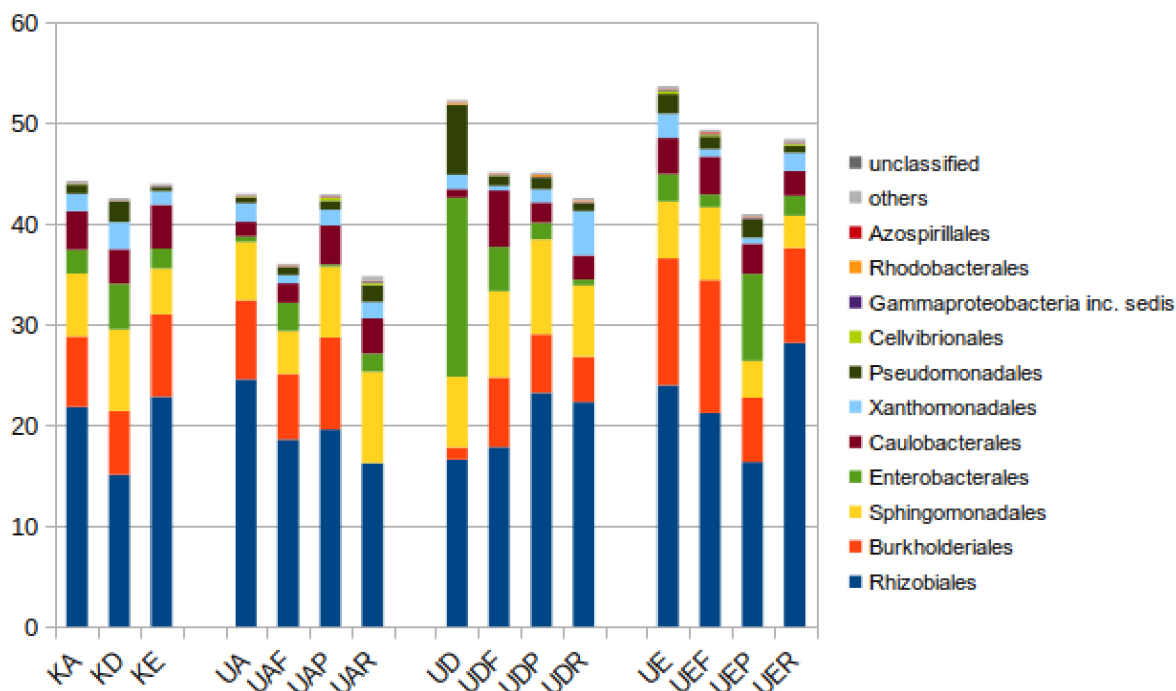
Hlízy ze supresivní půdy všech odrůd obsahovaly *Microbacteriaceae*, zvýšený podíl byl také u odrůdy Adéla téměř ve veškerém peridermu s výjimkou peridermu z konduktivní půdy ošetřené fosforem. Vyšší množství *Microbacteriaceae* bylo také u odrůdy David přítomno v hlízách z konduktivní půdy obohacené o rašelinu či fosfor. U odrůdy Agria bylo významné množství *Microbacteriaceae* v hlízách z konduktivní půdy a z konduktivní půdy obohacené o fosfor.

Je zajímavé, že téměř všechny hlízy včetně hlíz ze supresivní půdy obsahovaly vyšší množství aktinobakterií z čeledi *Nocardioideaceae* s výjimkou peridermu z konduktivní půdy u odrůdy Agria.

Odrůda Adéla měla poměrně vysoký podíl aktinobakterií z čeledi *Micrococcaceae* v hlízách z konduktivní půdy a jejích všech ošetřeních zejména však v konduktivní

půdě ošetřené železem. Podobný podíl byl v hlízách ze supresivních půdy všech odrůd a také u odrůdy David v peridermu z konduktivní půdy s příměsí rašeliny.

Odrůda David měla oproti ostatním odrůdám zvýšený výskyt aktinobakterií z čeledi *Promicromonosporaceae* v peridermu všech ošetření včetně supresivní půdy. U odrůdy Adéla nebyla tato čeleď aktinobakterií přítomna v téměř žádné míře. Odrůda Agria obsahovala *Promicromonosporaceae*, avšak v hlízách z konduktivní a supresivní půdy nebyl její výskyt zaznamenán.



Obr. 19 Zastoupení nejčastěji se vyskytujících řádů z kmene proteobakterií pro jednotlivá ošetření u odrůd Agria, David a Adéla

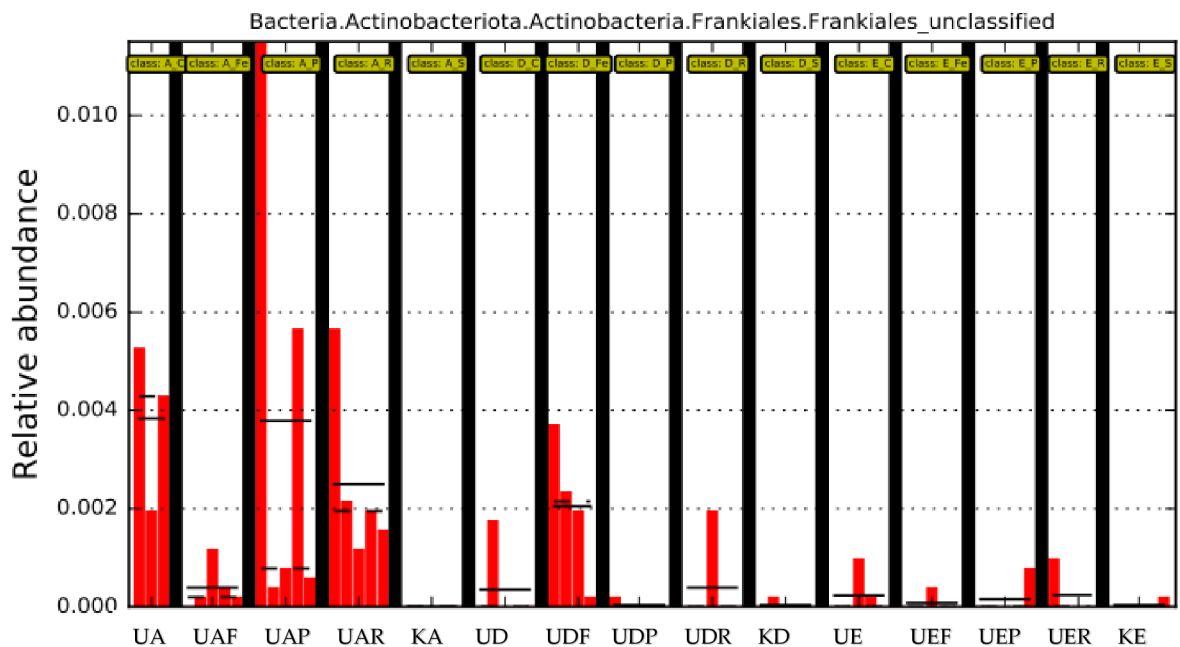
Nejčastěji vyskytujícím řádem z kmene proteobakterií u všech odrůd a všech ošetření byl řád *Rhizobiales*. Nejvyšší výskyt tohoto řádu byl zaznamenán u odrůdy Adéla v peridermu z konduktivní půdy ošetřené rašelinou. Nejméně zastoupený byl tento řád v hlízách z konduktivní půdy ošetřené fosforem u odrůdy Adéla. Podobně nízké množství disponovaly hlízy ze supresivní a konduktivní půdy u odrůdy David. Odrůda Agria měla nejnižší zastoupení *Rhizobiales* v peridermu z konduktivní půdy ošetřené rašelinou.

Dalším početně zastoupeným řádem byl řád *Burkholderiales*, nejvyšší poměr byl v hlízách u odrůdy Adéla. Nulové zastoupení tohoto řádu bylo zaznamenáno v peridermu z konduktivní půdy obohacené o rašelinu u odrůdy Agria.

Řád *Sphingomonadales* měl podobné zastoupení v hlízách všech odrůd u všech testovaných ošetření. Nejmenší výskyt byl v peridermu u odrůdy Adéla.

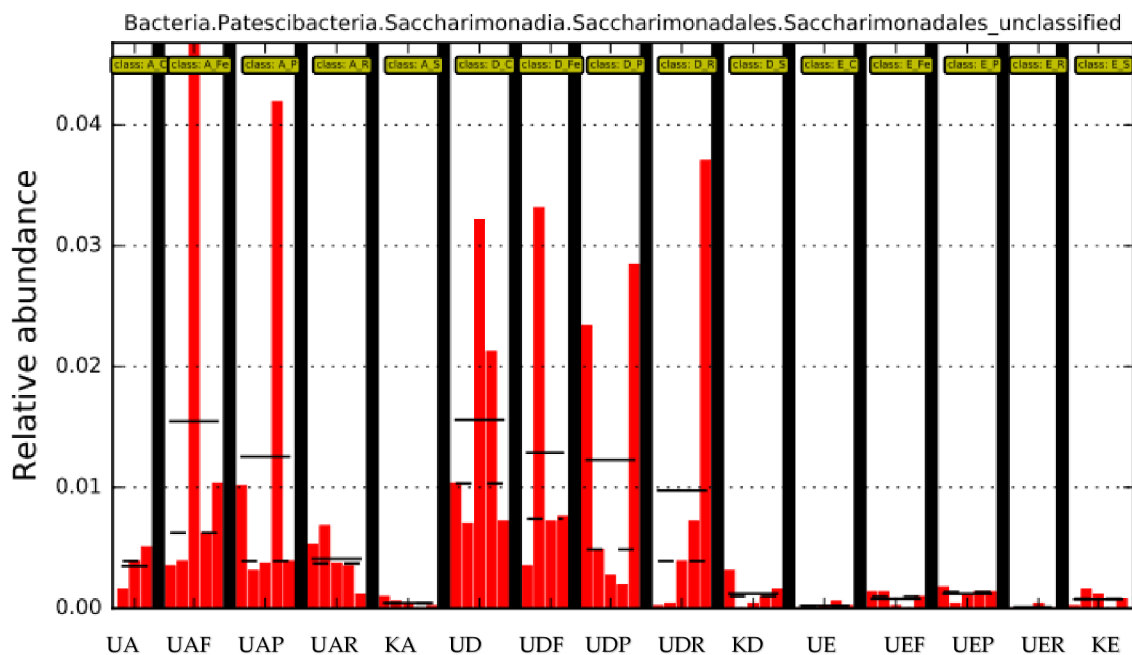
Avšak zajímavým je výskyt řádu *Enterobacteriales* v hlízách z konduktivní půdy odrůdy David. Výskyt řádu *Enterobacteriales* byl v hlízách z konduktivní půdy u odrůdy David dominantní nad všemi řády a v takovéto míře nebyl zaznamenán u žádného ošetření jiné odrůdy. Mírně vyšší obsah *Enterobacteriales* byl u odrůdy Adéla v hlízách z konduktivní půdy obohacené o fosfor. V hlízách z konduktivní půdy u odrůdy David byl vyšší výskyt řádu *Pseudomonadales*. Obdobně jako u *Enterobacteriales* nebyl podobný výskyt tohoto řádu zaznamenán u žádného dalšího ošetření u zbývajících odrůd.

Zastoupení bakteriálních společenstev v jednotlivých odrůdách pro daná ošetření byla podpořena statistickou metodou LDA Effect Size (LEfSe).



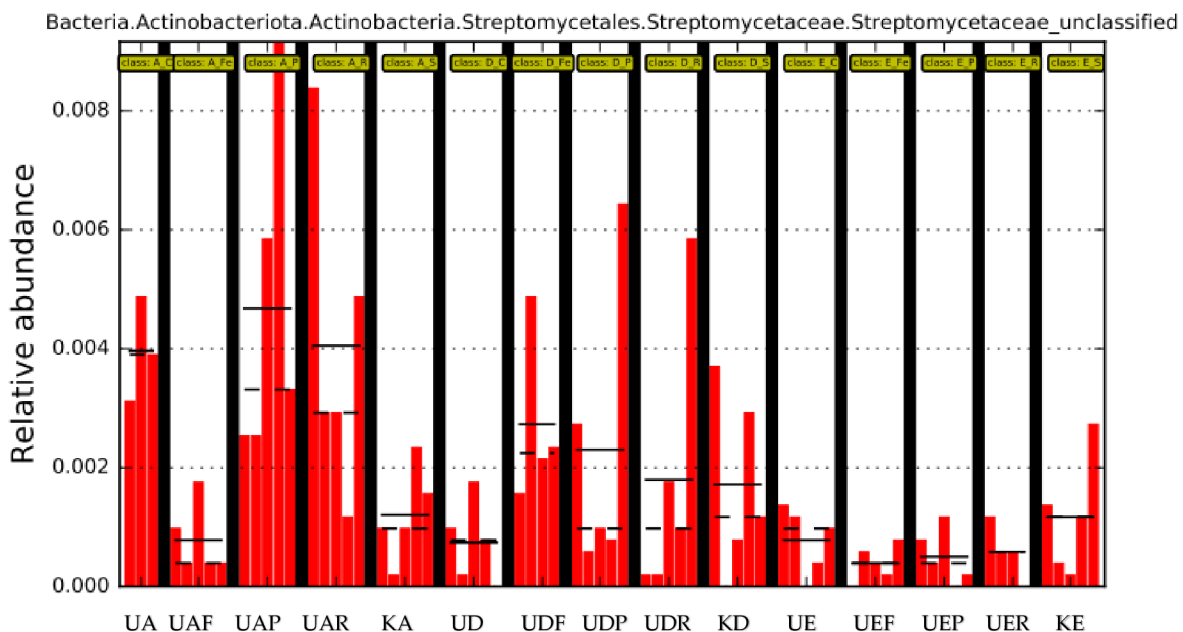
Obr. 20 Výskyt řádu *Frankiales* u všech odrůd pro všechna ošetření u jednotlivých vzorků

Nejhojnější zastoupení aktinobakterií z řádu *Frankiales* bylo u odrůdy Agria v hlízách z konduktivní půdy i ve všech jejích ošetřeních. Téměř nulový výskyt byl zaznamenán u odrůdy Adéla. Přítomnost *Frankiales* nebyla zaznamenána v supresivní půdě žádné odrůdy.



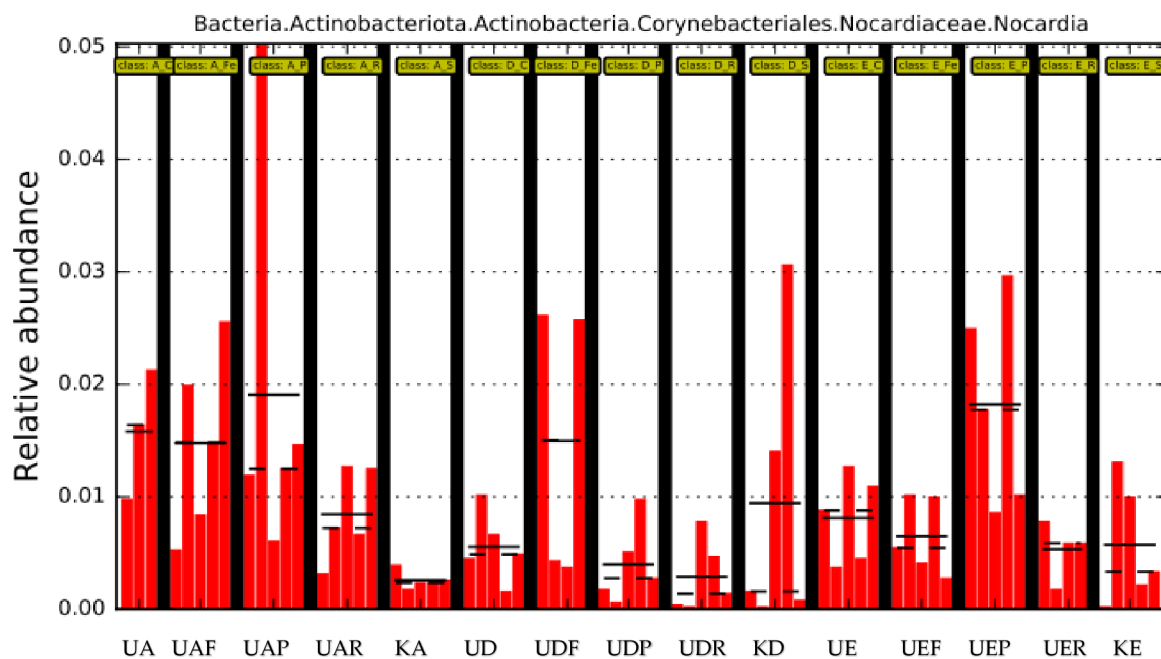
Obr.21 Výskyt řádu *Saccharimonadales* u všech odrůd pro všechna ošetření u jednotlivých vzorků

Podobně jako u předchozího společenstva (Obr. 16) byl i řád *Saccharimonadales* téměř potlačen v hlízách ze supresivních půd všech odrůd. Vysoké zastoupení tohoto společenstva bylo jako v předchozím případě u odrůdy Agria v některých případech. Avšak *Saccharimonadales* se ve velké míře vyskytovalo i u odrůdy David v hlízách z konduktivní půdy a ve všech jejích ošetřeních.



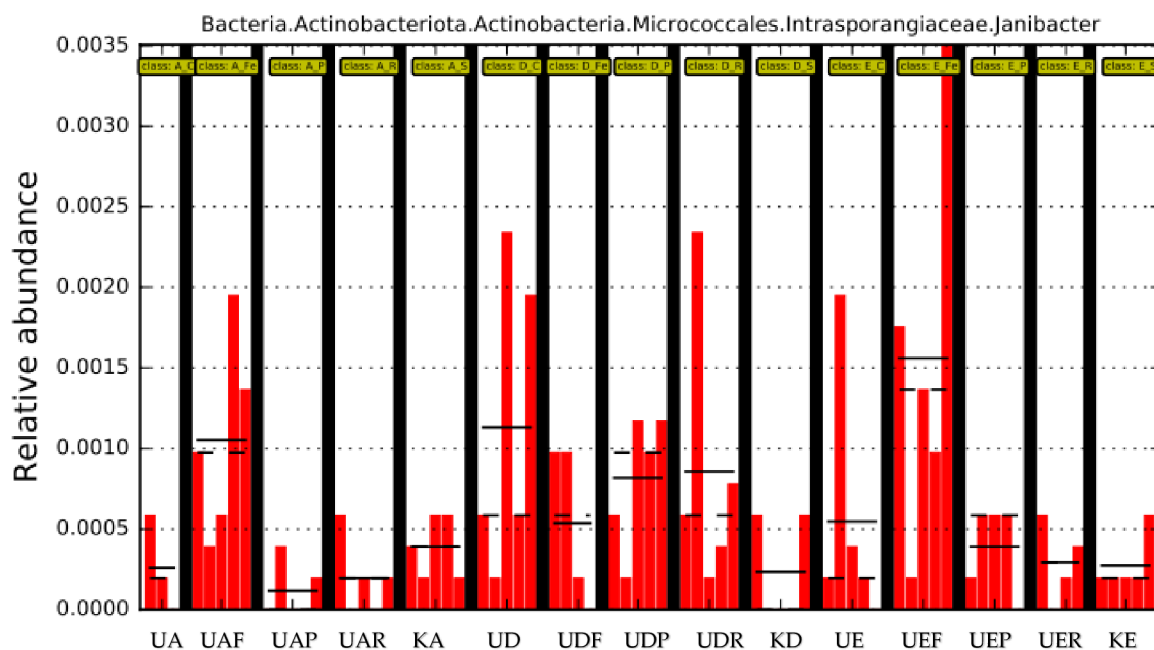
Obr.22 Výskyt čeledi *Streptomycetaceae* ve všech odrůdách pro všechna ošetření u jednotlivých vzorků

Do čeledi *Streptomycetaceae* patří jeden z nejznámějších původců aktinobakteriální strupovitosti *Streptomyces scabies*. Je patrné, že nejvyšší výskyt je u odrůdy Agria s výjimkou hlíz z konduktivní půdy ošetřené železem a supresivní půdy. Hojnější výskyt byl i v hlízách u odrůdy David s výjimkou hlíz ze supresivní půdy. Odrůda Adéla je vůči tomuto rodu bakterií téměř rezistentní.



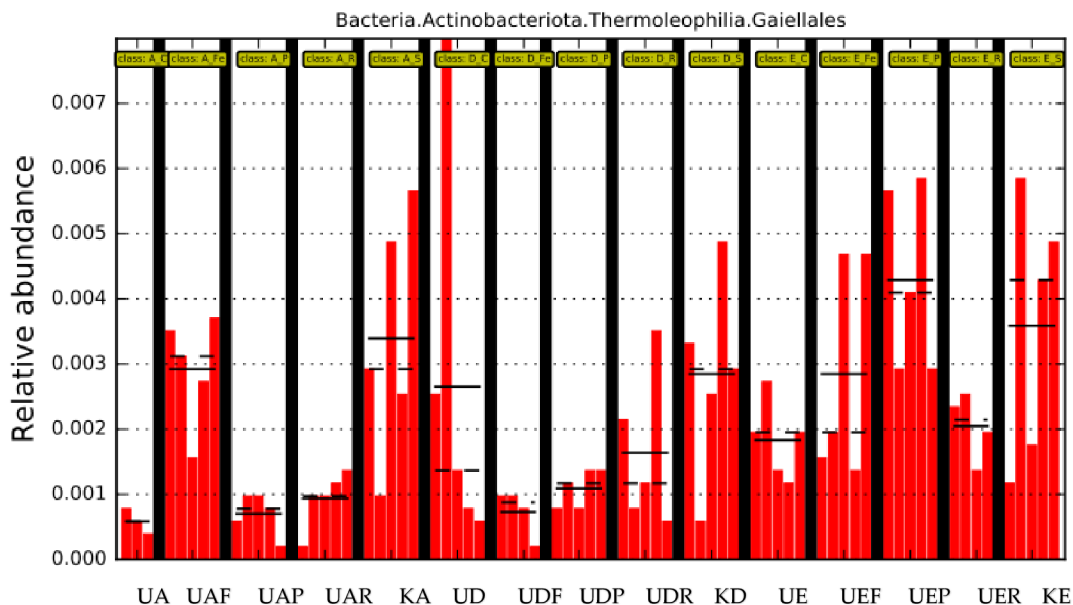
Obr.23 Výskyt rodu *Nocardia* u všech odrůd pro všechna ošetření u jednotlivých vzorků

Nejvyšší zastoupení rodu *Nocardia* z kmene aktinobakterií bylo u odrůdy Agria v hlízách z konduktivní půdy ošetřené fosforem. Podobných výsledků bylo dosaženo i u odrůdy Adéla u hlíz stejného ošetření. Toto bakteriální společenstvo se u těchto dvou odrůd téměř nevyskytovalo v supresivní půdě. Vyšší výskyt v hlízách ze supresivní půdy byl však u odrůdy David a podobné výsledky této odrůdy byly zjištěny i v peridermu z konduktivní půdy ošetřené železem.



Obr.24 Výskyt rodu *Janibacter* u všech odrůd pro všechna ošetření u jednotlivých vzorků

Výskyt bakterií z rodu *Janibacter* byl nejvyšší v hlízách odrůd Adéla a Agria. Avšak na rozdíl od předchozího případu se nejvíce vyskytoval v peridermu z konduktivní půdy ošetřené železem. Zatímco u odrůdy David se tento rod vyskytoval nejhojněji v peridermu z konduktivní půdy ošetřené rašelinou a u hlíz z kontrolní konduktivní půdy. Hlízy ze supresivní půdy proteobakterie z rodu *Janibacter* téměř postrádali u všech odrůd.



Obr.25 Výskyt řádu *Gaiellales* u všech odrůd pro všechna ošetření u jednotlivých vzorků

Nejhojnější výskyt aktinobakterií z řádu *Gaiellales* patřící do třídy *Thermoleophila* byl zaznamenán v hlízách u odrůdy Adéla ve všech testovaných ošetřeních. Nejmenší zastoupení měl tento řád v peridermu z konduktivní půdy a z konduktivní půdy ošetřené rašelinou. Velké zastoupení mělo bakteriální společenstvo řádu *Gaiellales* v peridermu ze supresivních půd ve zbývajících odrůdách, zejména u odrůdy Agria. Odrůda Agria měla vyšší zastoupení i v peridermu z konduktivní půdy ošetřené železem.

6 Diskuse

Onemocnění obecnou strupovitostí brambor bylo nejzávažnější u odrůdy Agria. Tato odrůda je známá svou vysokou náchylností k danému onemocnění (Křišťůfek et al., 2015). Hlízy ze supresivní půdy, kde je přirozeně potlačen výskyt patogenu, měly signifikantně nižší závažnost onemocnění oproti ostatním ošetřením. Mohli bychom se domnívat, že odrůda Agria vyžaduje půdy bohaté na železo, jelikož onemocnění bylo signifikantně nižší oproti kontrolní půdě právě na hlízách z konduktivní půdy ošetřené železem. K podobným výsledkům se došlo již dříve (Öztürk et al., 2011; Sarikhani et al., 2016), avšak autoři udávají, že na snížení závažnosti onemocnění má kromě železa vliv i obohacování rašelinou. V mém případě neměla rašelina na snížení závažnosti onemocnění statisticky významný podíl. Další živinou obohacující konduktivní půdu byl fosfor, v jehož případě byla strupovitost hlíz u odrůdy Agria signifikantně nižší oproti kontrolní půdě. Již dříve byl pozorován vysoký obsah fosforu v půdách na polích potlačující onemocnění obecnou strupovitostí (Lazarovits et al., 2007; Sagova-Mareckova et al., 2015).

Další testovanou odrůdou byla odrůda David, která je považována za náchylnější odrůdu vůči onemocnění (Sagova-Mareckova et al., 2016b). U odrůdy David byla nejnižší strupovitost v hlízách z konduktivní půdy obohacené o fosfor. Avšak nebyly pozorovány žádné statisticky významné odlišnosti mezi tímto ošetřením a dalšími testovanými ošetřeními. Signifikantně vyšší strupovitost byla mezi supresivní a konduktivní půdou. Tento jev je zcela přirozený, jelikož supresivní půda obsahuje živiny a bakteriální společenstva potlačující závažnost onemocnění na hlízách (Janvier et al., 2007). Kdežto konduktivní půda je používána jako kontrolní a činnost patogenu je podpořena přítomností jiných mikroorganismů.

Odrůda Adéla je považována za jednu z méně náchylných odrůd vůči obecné strupovitosti (Sagova-Mareckova et al., 2021). Výsledky tohoto šetření neprokázaly u odrůdy Adéla mezi jednotlivými ošetřeními žádné statisticky významné rozdílnosti. Avšak je patrné, že u odrůdy Adéla mělo obohacování půdy o fosfor, železo či rašelinu vliv na snížení závažnosti onemocnění na úroveň podobnou supresivní půdě. Železo a fosfor jsou živiny, které byly opakovaně spojovány se sníženou závažností onemocnění kvůli jejich účasti v obranných mechanismech rostliny vůči patogenům, a to nejen u této odrůdy (İnceoğlu et al., 2012; Sagova-Mareckova et al., 2016b; Kopecky et al., 2019).

Analýzou živin v peridermu byl zjišťován obsah tří prvků – železa, dusíku a fosforu. Nejvíce železa z testovaných odrůd bylo naměřeno u odrůdy Agria. Mezi jednotlivými opatřeními nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly obsahu železa

v peridermu. Vysoký podíl železa v peridermu u této odrůdy byl zjištěn i v předchozí studii (Sagova-Mareckova et al., 2016b). Výsledky tohoto šetření ukázaly, že nejvíce železa obsahovaly hlízy z konduktivní půdy ošetřené železem, což bylo ošetření se signifikantně nižší závažností onemocnění oproti kontrolní půdě. Již dříve bylo popsáno, že obsah železa v peridermu byl vyšší v lokalitách s vyšším obsahem železa v půdě, takže vztah ke koncentraci železa v půdě je pravděpodobný (Křišťůfek et al., 2015). Stejná studie popisuje, že obsah železa v různých odrůdách obvykle nesouvisí se závažností onemocnění obecnou strupovitostí, ale adekvátní výživa železem poskytuje odolnější stav (Aznar et al., 2015). Obsah železa obsaženého v peridermu u odrůd David a Adéla byl v podobné míře pro všechna opatření a nedosahoval hodnot jako opatření u odrůdy Agria. Tento fakt pouze potvrzuje, že odrůdy se odlišují ve svých požadavcích na železo (Öztürk et al., 2011).

Procentuální obsah dusíku v peridermu byl podobný pro všechna opatření u všech testovaných odrůd a mezi jednotlivými opatřeními nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly. Odrůdy David a Adéla obsahovaly ve svých hlízách o něco méně dusíku než odrůda Agria. Již dříve se udávalo, že odrůdy mají odlišné požadavky na množství dusíku a tím mohou vznikat rozdíly vlivu dusíku na onemocnění (Ospina et al., 2014). Existují starší studie, které poukázaly na potlačení onemocnění díky obohacení půdy o sójovou moučku bohaté na dusík. To vedlo ke zvýšení množství amoniaku či pH a tím došlo k omezení strupovitosti (Lazarovits et al., 1999).

Analýzou obsahu fosforu byly zjištěny signifikantně vyšší rozdíly v peridermu mezi ošetřením konduktivní půdy fosforem a rašelinou u odrůd Agria a David. U odrůdy Agria byla závažnost onemocnění hlíz z konduktivní půdy obohacené o fosfor signifikantně nižší než u hlíz z kontrolní půdy. Nedávné studie poukazují na negativní korelaci mezi onemocněním obecnou strupovitostí a celkovým obsahem fosforu v půdě i v bramborovém peridermu (Křišťůfek et al., 2015; Sagova-Mareckova et al., 2016a).

Další studie (Kopecky et al., 2019) se zabývala porovnáním živinového složení peridermu náchylné a rezistentní odrůdy mezi supresivní a konduktivní půdou. Výsledky ukázaly, že hlízy ze supresivní půdy rezistentní odrůdy obsahují vyšší množství fosforu a železa ve svém peridermu oproti hlízám náchylné odrůdy. Toto zjištění potvrzují i výsledky mého šetření. V mém případě byl v peridermu u odrůdy Adéla (rezistentní odrůda) také vyšší obsah fosforu a železa v supresivní půdě než v půdě konduktivní. Naopak náchylná odrůda Agria obsahovala v peridermu ze supresivní půdy méně železa a fosforu oproti peridermu z konduktivní půdy.

V konduktivní půdě byly pozorovány statisticky významné rozdíly ve složení bakteriálního společenstva mezi náchylnými odrůdami (Agria, David) a rezistentní

odrůdou Adéla. Rozdíly ve složení bakteriálního společenstva mezi náchylnou a rezistentní odrůdou byly popsány na stejných polích konduktivních a supresivních, z nichž byla použita půda pro tento experiment (Kopecky et al., 2019).

Zastoupení aktinobakterií (kmen *Actinobacteria*) z čeledi *Streptomycetaceae* bylo nejpočetnější u náchylných odrůd. Odrůda Agria měla nejnižší podíl této čeledi v peridermu z konduktivní půdy obohacené o železo, ale v tomto ošetření bylo vyšší zastoupení aktinobakterií z čeledi *Pseudonocardiaceae*. Podobně tomu bylo i v peridermu u rezistentní odrůdy Adéla ve všech ošetření konduktivní půdy. Mohli bychom tedy usuzovat, že na poměr zastoupení těchto čeledí aktinobakterií může mít jistý vliv obsah fosforu v peridermu. Jelikož právě toto ošetření u Agrie obsahovalo v peridermu nejméně fosforu a Adéla měla celkově ve svém peridermu nejmenší obsah fosforu ze všech testovaných odrůd. Další aktinobakterie mající vliv na fosfor jsou z rodu *Nocardia* (Roy et al., 2006), v mém šetření se tento rod vyskytoval u odrůd Agria a Adéla právě v konduktivní půdě obohacené o fosfor. Nedostatek fosforu má v rostlině za následek širokou škálu stresových a adaptačních reakcí a může tím být ovlivněn vývoj specifických bakteriálních skupin včetně patogenů (Sattar et al., 2019). Aktinobakterie z rodu *Nocardia*, *Streptomyces* a další jsou schopny uvolňovat fosfor z hornin nebo z jiných střídavě rozpustných forem vylučováním organických kyselin. Bakteriální společenstva se odlišují v uvolňování fosforu kvůli tlaku patogenů, který urychluje jeho recyklaci. Tento jev byl navržen jako částečný mechanismus potlačující nemoci v některých půdách (Gao et al., 2019).

U odrůdy Agria byl největší podíl aktinobakterií z čeledi *Streptomycetaceae* téměř ve všech ošetření s výjimkou hlíz z konduktivní půdy ošetřené fosforem. Do čeledi *Streptomycetaceae* patří i patogenní *Streptomyces* spp., takže zvýšený podíl těchto aktinobakterií u náchylných odrůd má patrně souvislost s výskytem onemocnění. Zvýšený podíl *Streptomycetaceae* u této odrůdy udávají i autoři nedávné studie, i když tam se zdá, že jde nejen o navýšení podílu patogenních streptomycet, ale také antagonistických kmenů stejného rodu (Kopecky et al., 2019).

Z proteobakterií (kmen *Proteobacteria*) byl ve všech ošetření u všech odrůd nejpočetněji zastoupen řád *Rhizobiales*. Na přítomnost *Rhizobiales* bylo poukázáno ve studii zabývající se onemocněním v závislosti na obohacování půdy rašelinou či železem (Sarikhani et al., 2016). Udává se, že *Rhizobiales* se vyskytovaly při ošetření rašelinou. Mimo tento řád byly také významné řády *Burkholderiales* a *Xanthomonadales*. V mém šetření byl pro každou odrůdu v konduktivní půdě ošetřené rašelinou typický jiný rod. U odrůdy Adéla převládaly proteobakterie z řádu *Rhizobiales* a *Burkholderiales*. U odrůdy David byl vedle těchto rodů i vyšší výskyt *Xanthomonadales*. Proteobakterie z řádu *Xanthomonadales* byl objeveny již dříve v Japonsku u rezistentních kultivarů

(Kobayashi et al., 2015). U odrůdy Agria nebyl zaznamenán výskyt *Burkholderiales* v žádné míře a *Rhizobiales* byl zastoupen méně než u předchozích odrůd.

Hlízy ze supresivní půdy obsahovaly zejména *Streptomyetaceae* z aktinobakterií a *Burkholderiales* z proteobakterií. O těchto rodech a čeledí je známo, že zahrnují rostlině prospěšné druhy a kmeny (Kyselková & Moënné-Loccoz, 2012). Proteobakterie z řádu *Burkholderiales* se v supresivní půdě vyskytovali i v již zmíněné studii (Kopecky et al., 2019). V mém šetření se tento rod vyskytoval u všech testovaných odrůd, avšak nejvíce byl zastoupen u rezistentní Adély.

Pomocí softwaru LEfSe bylo analyzováno, které OTU byly více zastoupeny pro daná ošetření u jednotlivých odrůd. Jedním z nich byli zástupci z řádu *Gaiellales*, kteří byli typičtí zejména pro rezistentní odrůdu Adéla. Udává se, že jsou účinní rozkladači rostlinných zbytků přizpůsobených vysokému zatížení živinami (Lin et al., 2019). Výskyt tohoto bakteriálního společenstva u odrůdy Adéla je uveden v nedávné studii (Sagova-Mareckova et al., 2021).

Z mého šetření vyplývá, že k potlačení obecné strupovitosti došlo nejefektivněji na peridermu hlíz z konduktivní půdy ošerené železem. Avšak pouze u odrůdy Agria byl tento pokles signifikantně nižší oproti kontrolní půdě. U odrůdy David bylo patrné zlepšení onemocnění, ale nebyl pozorován signifikantně nižší pokles oproti kontrole. Zároveň byly tyto hlízy ve svém peridermu bohaté na železo a dusík, ale chudší na fosfor. U odrůdy Adéla byla prokázána její přirozená rezistence vůči obecné strupovitosti.

7 Závěr

- Strupovitost byla nejnižší u rezistentní odrůdy Adéla – ve všech ošetření konduktivní půdy došlo k významnému snížení závažnosti na úroveň supresivní půdy.
- Náchylné odrůdy měly nejmenší závažnost onemocnění na peridermu z konduktivní půdy ošetřené fosforem, ale jen u Agrie byl zaznamenán signifikantně nižší výskyt onemocnění oproti kontrolní půdě.
- Periderm u náchylné odrůdy Agria v ošetření vykazující nejnižší strupovitost byl bohatý na železo a dusík, ale obsahoval méně fosforu.
- Odrůda Agria měla v peridermu nejvíce železa z testovaných odrůd. To poukazuje na různorodé požadavky odrůd na jednotlivé živiny.
- Listy všech testovaných odrůd obsahovaly podobné množství železa, fosforu i dusíku.
- Rezistentní Adéla měla v peridermu ze supresivní půdy vyšší obsah železa a fosforu oproti hlízám z kontrolní půdy.
- Odrůda Agria měla nejvyšší procentuální zastoupení rodu *Streptomyces* (kmen *Actinobacteria*), který obsahuje i patogenní druhy.

8 Literatura

- Adams, E., & Shin, R. (2014). Transport, signaling, and homeostasis of potassium and sodium in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(3), 231-249. <https://doi.org/10.1111/jipb.12159>
- Anderson, I., Abt, B., Lykidis, A., Klenk, H., Kyrpides, N., Ivanova, N., & Ben-Jacob, E. (2012). Genomics of Aerobic Cellulose Utilization Systems in Actinobacteria. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039331>
- Andrews, M., Raven, J., & Lea, P. (2013). Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of Applied Biology*, 163(2), 174-199. <https://doi.org/10.1111/aab.12045>
- Aznar, A., Chen, N., Thomine, S., & Dellagi, A. (2015). Immunity to plant pathogens and iron homeostasis. *Plant Science*, 240, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.08.022>
- Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. (2015). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Bignell, D., Francis, I., Fyans, J., & Loria, R. (2014). Thaxtomin A Production and Virulence Are Controlled by Several bld Gene Global Regulators in *Streptomyces scabies*. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 27(8), 875-885. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-14-0037-R>
- Bignell, D., Huguet-Tapia, J., Joshi, M., Pettis, G., & Loria, R. (2010). What does it take to be a plant pathogen: genomic insights from *Streptomyces* species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98(2), 179-194. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9429-1>
- Bischoff, V., Cookson, S., Wu, S., & Scheible, W. (2009). Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 60(3), 955-965. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern344>
- Bouček-Mechiche, K., Gardan, L., Andrivon, D., & Normand, P. (2006). *Streptomyces turgidiscabies* and *Streptomyces reticuliscabiei*: one genomic species, two pathogenic groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(12), 2771-2776. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63161-0>
- Bouček-Mechiche, K., Gardan, L., Normand, P., & Jouan, B. (2000b). DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated

with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1), 91-99. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-91>

Bouchek-Mechiche, Pasco, Andrivon, & Jouan. (2000a). Differences in host range, pathogenicity to potato cultivars and response to soil temperature among *Streptomyces* species causing common and netted scab in France. *Plant Pathology*, 49(1), 3-10. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00419.x>

Braun, S., Gevens, A., Charkowski, A., Allen, C., & Jansky, S. (2017). Potato Common Scab: a Review of the Causal Pathogens, Management Practices, Varietal Resistance Screening Methods, and Host Resistance. *American Journal of Potato Research*, 94(4), 283-296. <https://doi.org/10.1007/s12230-017-9575-3>

Carlgren, K., & Mattsson, L. (2001). Swedish Soil Fertility Experiments. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science*, 51(2), 49-76. <https://doi.org/10.1080/090647101753483787>

Clarke, C., Kramer, C., Kotha, R., Wanner, L., Luthria, D., & Kramer, M. (2019). Cultivar Resistance to Common Scab Disease of Potato Is Dependent on the Pathogen Species. *Phytopathology*®, 109(9), 1544-1554. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-18-0368-R>

Colombo, C., Palumbo, G., He, J., Pinton, R., & Cesco, S. (2014). Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of Soils and Sediments*, 14(3), 538-548. <https://doi.org/10.1007/s11368-013-0814-z>

Dees, M., Sletten, A., & Hermansen, A. (2013). Isolation and characterization of *Streptomyces* species from potato common scab lesions in Norway. *Plant Pathology*, 62(1), 217-225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02619.x>

Dees, M., & Wanner, L. (2012). In Search of Better Management of Potato Common Scab. *Potato Research*, 55(3-4), 249-268. <https://doi.org/10.1007/s11540-012-9206-9>

Dordas, C. (2008). Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 28(1), 33-46. <https://doi.org/10.1051/agro:2007051>

Durán, P., Tortella, G., Viscardi, S., Barra, P., Carrión, V., Mora, M., & Pozo, M. (2018). Microbial Community Composition in Take-All Suppressive Soils. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02198>

Eppendorfer, W., & Eggum, B. (1994). Effects of sulphur, nitrogen, phosphorus, potassium, and water stress on dietary fibre fractions, starch, amino acids and on the biological value of potato protein. *Plant Foods for Human Nutrition*, 45(4), 299-313. <https://doi.org/10.1007/BF01088079>

Flores-González, R., Velasco, I., & Montes, F. (2007). Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. *Plant Pathology*, 0(0), 071202153352001-???. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01734.x>

Gao, Z., Karlsson, I., Geisen, S., Kowalchuk, G., & Jousset, A. (2019). Protists: Puppet Masters of the Rhizosphere Microbiome. *Trends in Plant Science*, 24(2), 165-176. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.10.011>

Glick, B. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012, 1-15. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

Goodfellow, M., & Williams, S. (1983). Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 37(1), 189-216. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001201>

Goyer, C., Otrysko, B., & Beaulieu, C. (1996). Taxonomie studies on streptomyces causing potato common scab: a review. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18(2), 107-113. <https://doi.org/10.1080/07060669609500633>

HAMMOND, J. (2004). Genetic Responses to Phosphorus Deficiency. *Annals of Botany*, 94(3), 323-332. <https://doi.org/10.1093/aob/mch156>

Hausvater, E., Doležal, P., & Bašťová, P. (2016). *Aktinobakteriální obecná strupovitost bramboru* (Vydání třetí, aktualizované). Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

Hausvater, E., Doležal, P., & Bašťová, P. (2020). *Škodliví činitelé bramboru poškozující hlízy* (Vydání druhé, aktualizované). Výzkumný ústav bramborářský, s.r.o.

Healy, F., Krasnoff, S., Wach, M., Gibson, D., & Loria, R. (2002). Involvement of a Cytochrome P450 Monooxygenase in Thaxtomin A Biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. *Journal of Bacteriology*, 184(7), 2019-2029. <https://doi.org/10.1128/JB.184.7.2019-2029.2002>

Healy, F., Wach, M., Krasnoff, S., Gibson, D., & Loria, R. (2000). The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Molecular Microbiology*, 38(4), 794-804. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02170.x>

Hill, J., & Lazarovits, G. (2005). A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27(1), 46-52. <https://doi.org/10.1080/07060660509507192>

Hopkins, B., Horneck, D., & MacGuidwin, A. (2014). Improving Phosphorus Use Efficiency Through Potato Rhizosphere Modification and Extension. *American Journal of Potato Research*, 91(2), 161-174. <https://doi.org/10.1007/s12230-014-9370-3>

Hopwood, D. (2006). Soil To Genomics: The *Streptomyces* Chromosome. *Annual Review of Genetics*, 40(1), 1-23. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090639>

Hornby, D. (1998). Diseases caused by soilborne pathogens. In D. Jones (ed.), *The Epidemiology of Plant Diseases* (pp. 308-322). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-3302-1_15

Hudec, C., Novinscak, A., & Fillion, M. (2021). Diversity and Virulence of *Streptomyces* spp. Causing Potato Common Scab in Prince Edward Island, Canada. *Phytopathology*®, 111(4), 617-626. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0339-R>

Chater, K. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000Research*, 5. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9534.1>

İnceoğlu, Ö., Falcão Salles, J., & van Elsas, J. (2012). Soil and Cultivar Type Shape the Bacterial Community in the Potato Rhizosphere. *Microbial Ecology*, 63(2), 460-470. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9930-8>

Jákli, B., Tränkner, M., Senbayram, M., & Dittert, K. (2016). Adequate supply of potassium improves plant water-use efficiency but not leaf water-use efficiency of spring wheat. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 179(6), 733-745. <https://doi.org/10.1002/jpln.201600340>

Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., & Steinberg, C. (2007). Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators?. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.07.001>

Joshi, M., Rong, X., Moll, S., Kers, J., Franco, C., & Loria, R. (2007). *Streptomyces turgidiscabies* Secretes a Novel Virulence Protein, Nec1, Which Facilitates Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 20(6), 599-608. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0599>

Kim, S. (2003). *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83(2), 107-116. <https://doi.org/10.1023/A:1023397724023>

King, R., Lawrence, C., & Calhoun, L. (1992). Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies* the causal organism of potato common scab. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(5), 834-837. <https://doi.org/10.1021/jf00017a025>

King, R., Lawrence, C., Clark, M., & Calhoun, L. (1989). Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (13). <https://doi.org/10.1039/c39890000849>

Kobayashi, A., Kobayashi, Y., Someya, N., & Ikeda, S. (2015). Community Analysis of Root- and Tuber-Associated Bacteria in Field-Grown Potato Plants Harboring Different Resistance Levels against Common Scab. *Microbes and environments*, 30(4), 301-309. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME15109>

Koch, M., Busse, M., Naumann, M., Jáklí, B., Smit, I., Cakmak, I., Hermans, C., & Pawelzik, E. (2019). Differential effects of varied potassium and magnesium nutrition on production and partitioning of photoassimilates in potato plants. *Physiologia Plantarum*, 166(4), 921-935. <https://doi.org/10.1111/ppl.12846>

Koch, M., Naumann, M., Pawelzik, E., Gransee, A., & Thiel, H. (2020). The Importance of Nutrient Management for Potato Production Part I: Plant Nutrition and Yield. *Potato Research*, 63(1), 97-119. <https://doi.org/10.1007/s11540-019-09431-2>

Kopecky, J., Rapoport, D., Sarikhani, E., Stovicek, A., Patrmanova, T., & Sagova-Mareckova, M. (2021). Micronutrients and Soil Microorganisms in the Suppression of Potato Common Scab. *Agronomy*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/agronomy11020383>

Kopecky, J., Samkova, Z., Sarikhani, E., Kyselková, M., Omelka, M., Kristufek, V., Divis, J., Grundmann, G., Moëgne-Loccoz, Y., & Sagova-Mareckova, M. (2019). Bacterial, archaeal and micro-eukaryotic communities characterize a disease-suppressive or conducive soil and a cultivar resistant or susceptible to common scab. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51570-6>

Koprivova, A., & Kopriva, S. (2016). Sulfur metabolism and its manipulation in crops. *Journal of Genetics and Genomics*, 43(11), 623-629. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.07.001>

Krištufek, V., Diviš, J., Dostálková, I., & Kalčík, J. (2000). Accumulation of mineral elements in tuber periderm of potato cultivars differing in susceptibility to common scab. *Potato Research*, 43(2), 107-114. <https://doi.org/10.1007/BF02357951>

Krištufek, V., Diviš, J., Omelka, M., Kopecký, J., & Sagová-Marečková, M. (2015). Site, Year and Cultivar Effects on Relationships Between Periderm Nutrient Contents and Common Scab Severity. *American Journal of Potato Research*, 92(4), 473-482. <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9456-6>

Kyselková, M., & Moëgne-Loccoz, Y. (2012). Pseudomonas and other Microbes in Disease-Suppressive Soils. In E. Lichtfouse (ed.), *Organic Fertilisation, Soil Quality and Human Health* (pp. 93-140). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4113-3_5

LAMBERT, D., & LORIA, R. (1989a). *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(4), 387-392. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-4-387>

LAMBERT, D., & LORIA, R. (1989b). *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(4), 393-396. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-4-393>

- Lambert, D., Powelson, M., & Stevenson, W. (2005). Nutritional interactions influencing diseases of potato. *American Journal of Potato Research*, 82(4), 309-319. <https://doi.org/10.1007/BF02871961>
- Lazarovits, G., Conn, K., & Potter, J. (1999). Reduction of potato scab, verticillium wilt, and nematodes by soymeal and meat and bone meal in two Ontario potato fields. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21(4), 345-353. <https://doi.org/10.1080/07060669909501170>
- Lazarovits, G. (2010). Managing Soilborne Disease of Potatoes Using Ecologically Based Approaches. *American Journal of Potato Research*, 87(5), 401-411. <https://doi.org/10.1007/s12230-010-9157-0>
- Lazarovits, G., Hill, J., Patterson, G., Conn, K., & Crump, N. (2007). Edaphic Soil Levels of Mineral Nutrients, pH, Organic Matter, and Cationic Exchange Capacity in the Geocaulosphere Associated with Potato Common Scab. *Phytopathology*®, 97(9), 1071-1082. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-9-1071>
- Lehtonen, M., Rantala, H., Kreuzer, J., Bang, H., Kuisma, L., Koski, P., Virtanen, E., Vihlman, K., & Valkonen, J. (2004). Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces* species) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. *Plant Pathology*, 53(3), 280-287. <https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.01009.x>
- LERAT, S., SIMAO-BEAUNOIR, A., & BEAULIEU, C. (2009). Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, 10(5), 579-585. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00561.x>
- Lindholm, P., Kortemaa, H., Kokkola, M., Haahtela, K., Salkinoja-Salonen, M., & Valkonen, J. (1997). *Streptomyces* spp. Isolated from Potato Scab Lesions Under Nordic Conditions in Finland. *Plant Disease*, 81(11), 1317-1322. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.11.1317>
- Lin, Y., Ye, G., Kuzyakov, Y., Liu, D., Fan, J., & Ding, W. (2019). Long-term manure application increases soil organic matter and aggregation, and alters microbial community structure and keystone taxa. *Soil Biology and Biochemistry*, 134, 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.03.030>
- Loria, R., Bukhalid, R., Fry, B., & King, R. (1997a). PLANT PATHOGENICITY IN THE GENUS *STREPTOMYCES*. *Plant Disease*, 81(8), 836-846. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.8.836>
- Loria, R., Bukhalid, R., Fry, B., & King, R. (1997b). PLANT PATHOGENICITY IN THE GENUS *STREPTOMYCES*. *Plant Disease*, 81(8), 836-846. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.8.836>

Loria, R., Kers, J., & Joshi, M. (2006). Evolution of Plant Pathogenicity in *Streptomyces*. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 469-487. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.032905.091147>

Mazzola, M. (2002). Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(14), 557-564. <https://doi.org/10.1023/A:1020557523557>

Nahar, K., Goyer, C., Zebarth, B., Burton, D., & Whitney, S. (2018). Pathogenic *Streptomyces* spp. Abundance Affected by Potato Cultivars. *Phytopathology*[®], 108(9), 1046-1055. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-18-0075-R>

Ospina, C., Lammerts van Bueren, E., Allefs, J., Engel, B., van der Putten, P., van der Linden, C., & Struik, P. (2014). Diversity of crop development traits and nitrogen use efficiency among potato cultivars grown under contrasting nitrogen regimes. *Euphytica*, 199(1-2), 13-29. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1203-4>

Öztürk, E., Atsan, E., & Polat, T. (2011). Variation in heavy metal concentrations of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(2), 235-239.

Richardson, A., & Simpson, R. (2011). Soil Microorganisms Mediating Phosphorus Availability Update on Microbial Phosphorus. *Plant Physiology*, 156(3), 989-996. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>

Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P., Lauber, C., Lozupone, C., Caporaso, J., Knight, R., & Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal*, 4(10), 1340-1351. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.58>

Roy, R., Finck, A., Blair, G., & Tandon, H. (2006). *Plant nutrition for food security*.

Sagova-Mareckova, M., Omelka, M., Kopecky, J., & de Boer, W. (2016a). Sequential analysis of soil factors related to common scab of potatoes. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(1). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw201>

Sagova-Mareckova, M., Omelka, M., Kopecky, J., & de Boer, W. (2016b). Sequential analysis of soil factors related to common scab of potatoes. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(1). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw201>

Sagova-Mareckova, M., Daniel, O., Omelka, M., Kristufek, V., Divis, J., Kopecky, J., & Berg, G. (2015). Determination of Factors Associated with Natural Soil Suppressivity to Potato Common Scab. *PLOS ONE*, 10(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116291>

Sagova-Mareckova, M., Ensyeh, S., Daniel, O., Omelka, M., Kristufek, V., Divis, J., & Kopecky, J. (2021). Tuberosphere and bulk soil microbial communities in fields differing in common scab severity are distinguished by soil chemistry and interactions

with pathogens. *Plant and Soil*, 468(1-2), 259-275. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05128-z>

Sarikhani, E., Sagova-Mareckova, M., Omelka, M., Kopecky, J., & Sessitsch, A. (2016). The effect of peat and iron supplements on the severity of potato common scab and bacterial community in tuberosphere soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(1). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw206>

Sarwar, A., Latif, Z., Cabaleiro, C., Amin, A., & Saleem, M. (2019). First Report of *Streptomyces europaeiscabiei* Causing Potato Common Scab in Galicia, Spain. *Plant Disease*, 103(6), 1407-1407. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1397-PDN>

Sattar, A., Naveed, M., Ali, M., Zahir, Z., Nadeem, S., Yaseen, M., Meena, V., Farooq, M., Singh, R., Rahman, M., & Meena, H. (2019). Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. *Applied Soil Ecology*, 133, 146-159. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.09.012>

Sbírka zákonů Česká republika. (2010). Moraviapress.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>

Seipke, R., & Loria, R. (2008). *Streptomyces scabies* 87-22 Possesses a Functional Tomatinase. *Journal of Bacteriology*, 190(23), 7684-7692. <https://doi.org/10.1128/JB.01010-08>

Senbayram, M., Gransee, A., Wahle, V., & Thiel, H. (2015). Role of magnesium fertilisers in agriculture: plant–soil continuum. *Crop and Pasture Science*, 66(12). <https://doi.org/10.1071/CP15104>

Silva, J., França, M., Gomide, F., & Magalhaes, J. (2013). Different Nitrogen Sources Affect Biomass Partitioning and Quality of Potato Production in a Hydroponic System. *American Journal of Potato Research*, 90(2), 179-185. <https://doi.org/10.1007/s12230-012-9297-5>

Song, J., Lee, S., Kang, J., Baek, H., & Suh, J. (2004). Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S–23S rDNA internally transcribed spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 203-209. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02624-0>

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G., Chater, K., & van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 495-548. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07>

Wanner, L. (2006). A Survey of Genetic Variation in Streptomyces Isolates Causing Potato Common Scab in the United States. *Phytopathology*®, 96(12), 1363-1371. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1363>

Wanner, L. (2009). A Patchwork of Streptomyces Species Isolated from Potato Common Scab Lesions in North America. *American Journal of Potato Research*, 86(4), 247-264. <https://doi.org/10.1007/s12230-009-9078-y>

Waterer, D. (2002). Management of common scab of potato using planting and harvest dates. *Canadian Journal of Plant Science*, 82(1), 185-189. <https://doi.org/10.4141/P01-030>

Wenzl, H., & Demel, J. (1967). Bildskalen für die Beurteilung von Kartoffelschorf und Rhizoctonia-Pocken. *Der Pflanzenarzt*.

Whalley, H., & Knight, M. (2013). Calcium signatures are decoded by plants to give specific gene responses. *New Phytologist*, 197(3), 690-693. <https://doi.org/10.1111/nph.12087>

White, P., & Broadley, M. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182(1), 49-84. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02738.x>

Wilson, C., Luckman, G., Tegg, R., Yuan, Z., Wilson, A., Eyles, A., & Conner, A. (2009). Enhanced resistance to common scab of potato through somatic cell selection in cv. Iwa with the phytotoxin thaxtomin A. *Plant Pathology*, 58(1), 137-144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01903.x>

Xiao, Y., Wang, X., Chen, W., & Huang, Q. (2017). Isolation and Identification of Three Potassium-Solubilizing Bacteria from Rape Rhizospheric Soil and Their Effects on Ryegrass. *Geomicrobiology Journal*, 34(10), 873-880. <https://doi.org/10.1080/01490451.2017.1286416>

Zebarth, B., & Rosen, C. (2007). Research perspective on nitrogen bmp development for potato. *American Journal of Potato Research*, 84(1), 3-18. <https://doi.org/10.1007/BF02986294>